

Charakterisierung der Transkriptionsregulatoren
TrmB und TrmBL1 im Metabolismus des Archaeons
Pyrococcus furiosus



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Antonia Gindner
aus Regensburg

im Jahr 2014

Charakterisierung der Transkriptionsregulatoren
TrmB und TrmBL1 im Metabolismus des Archaeons
Pyrococcus furiosus



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Antonia Gindner
aus Regensburg

im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 25. September 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Michael Thomm

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Allgemeines	1
2.	Der Zuckermetabolismus in <i>Pyrococcus furiosus</i>	2
3.	Archaeelle Transkription und ihre Regulation	7
4.	Transkriptionsregulatoren der TrmB-Familie	10
4.1.	Der Transkriptionsregulator TrmB	12
4.2.	Der Transkriptionsregulator TrmBL1	16
5.	Der Transkriptionsfaktor aMBF1 (PF0512)	16
6.	Zielsetzung der Arbeit	18
II.	Materialien und Methoden	19
1.	Chemikalien	19
2.	Bakterien- und Archaeenstämmen	21
3.	Plasmide und Vektoren	21
4.	Enzyme und Standards	22
5.	Kits	22
6.	Allgemeine Puffer	23
7.	Molekularbiologische Methoden	23
7.1.	Isolierung von Nukleinsäuren	23
7.1.1.	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	23
7.1.2.	Isolierung von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	23
7.1.3.	Ethanol-fällung von DNA	23
7.2.	Polymerasekettenreaktion [Mullis <i>et al.</i> , 1992]	24
7.2.1.	Standard-PCR	24
7.2.2.	Kolonie-PCR	25
7.2.3.	Fusions-PCR [Higuchi, 1990]	25
7.2.4.	Mutations-PCR	27
7.3.	Weitere Standardmethoden	27
7.3.1.	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese	27
7.3.2.	Präparative Agarosegelelektrophorese	27
7.3.3.	Überprüfung des Reinheitsgrades und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
7.4.	Klonierungen in <i>Escherichia coli</i>	28
7.4.1.	Erzeugung der DNA-Matrizen für Klonierungen in <i>Escherichia coli</i>	28
7.4.2.	Restriktionshydrolyse	29
7.4.3.	Ligation	30
7.4.4.	Hitzeschock-Transformation in <i>Escherichia coli</i> [Hanahan, 1983]	30

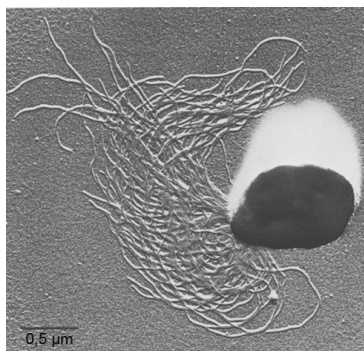
7.4.5. Antibiotika-Selektion und α -Komplementation	30
7.4.6. Sequenzierung	31
7.4.7. Klonierung des Proteins PF0512	31
7.5. Klonierungen in <i>Pyrococcus furiosus</i>	31
7.5.1. Erzeugung der DNA-Matrizen für Klonierungen in <i>Pyrococcus furiosus</i>	32
7.5.2. Hitzeschock-Transformation bei <i>Pyrococcus furiosus</i>	32
7.6. Electrophoretic Mobility Shift Assays	33
7.6.1. Erstellung der DNA-Matrizen für EMSAs	33
7.6.2. Bindung von Proteinen an fluoreszenzmarkierte DNA	34
7.6.3. Polyacrylamidgelelektrophorese	34
7.7. <i>In vitro</i> Transkriptionen	34
7.7.1. Erstellung der DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> Transkriptionen	34
7.7.2. Run-off <i>in vitro</i> Transkription	34
7.7.3. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese	35
7.8. DNaseI Footprinting	35
7.8.1. Erstellung der DNA-Matrizen für die DNaseI Footprinting-Versuche	36
7.8.2. Erzeugung von DNaseI Footprints	36
7.8.3. Sequenzgelelektrophorese	37
8. Proteinbiochemische Verfahren	37
8.1. Zellaufschluss und Hitzefällung	37
8.2. Chromatographien	38
8.2.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie	38
8.2.2. Gelfiltrationschromatographie	38
8.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	39
8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
9. Organismische Methoden	40
9.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	40
9.1.1. Expression von Proteinen	41
9.2. Kultivierung von <i>Pyrococcus furiosus</i>	41
III. Ergebnisse	43
1. TrmB und TrmBL1 besitzen keine multiplen DNA-Bindehelices in ihrer DNA-Bindedomäne	43
1.1. Versuche mit TrmB- und TrmBL1-Helixmutanten	43
1.1.1. <i>In vitro</i> Transkriptionen am TM-Promotor	44
1.1.2. <i>In vitro</i> Transkriptionen am MD-Promotor	45
2. <i>In vivo</i> Versuche zu TrmBL1 mit <i>Pyrococcus furiosus</i>	47
2.1. Erstellung der TrmBL1-modifizierten <i>P. furiosus</i> Stämme MURPf33-36	47
2.2. Wachstumsanalysen zu MURPf33 und MURPf34	47
3. Neue TrmBL1-regulierte Gene	48
3.1. EMSAs mit TrmBL1 an neu identifizierten Zielpromotoren	49
3.1.1. Kontroll-EMSAs mit bereits bekannten Promotoren	49
3.1.2. Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren	50

3.2.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit TrmBL1 an den neu identifizierten Promotoren	54
3.2.1.	Kontroll-Transkriptionen mit bereits bekannten Promotoren	54
3.2.2.	Transkriptionen mit TrmBL1 an Promotoren mit TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box	55
3.2.3.	Transkriptionen mit TrmBL1 an Promotoren mit TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box	58
3.3.	EMSAs mit aMBF1	60
3.4.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit aMBF1	61
3.4.1.	aMBF1 stimuliert die Transkription	61
3.4.2.	aMBF1 hat keine aktivierende Wirkung auf die Transkription mit TrmBL1	63
3.5.	Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle durch DNaseI Footprints	64
3.6.	Zusammenfassung aller Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten <i>in vitro</i> Experimente mit TrmBL1	67
IV.	Diskussion	69
1.	TrmB und TrmBL1 besitzen keine multiplen DNA-Bindehelices in ihrer DNA-Bindedomäne	69
2.	Wachstum von <i>Pyrococcus furiosus</i> Wildtyp sowie der TrmBL1-Deletionsmutante .	71
3.	Neue TrmBL1-regulierte Gene	72
V.	Zusammenfassung	81
VI.	Summary	83
VII.	Abkürzungen	85
1.	Allgemeine Abkürzungen	85
2.	Symbole für den Nukleinsäurecode	87
3.	Symbole für Aminosäuren	87
VIII.	Abbildungsverzeichnis	89
IX.	Literaturverzeichnis	91
X.	Anhang	101
1.	Promotorstrukturen	101
2.	Proteinreinigungen	121
XI.	Danksagung	127
XII.	Erklärung	129

I. Einleitung

1. Allgemeines

Der aktuelle Stammbaum des Lebens nach Carl Woese, Otto Kandler und Mark Wheelis setzt sich zusammen aus den drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eucarya*, wobei die *Bacteria* und *Archaea* zu den Prokaryoten gezählt werden [Woese *et al.*, 1990]. Die *Archaea* nehmen dabei eine Sonderstellung ein, da sie viele Gemeinsamkeiten sowohl mit den *Bacteria* als auch den *Eucarya* besitzen [Keeling und Doolittle, 1995]. Zumeist sind sie Bewohner extremer Habitats mit den unterschiedlichsten Anpassungen an die dort herrschenden Umweltbedingungen. Einer der am besten untersuchten Mikroorganismen ist der Euryarchaeot *Pyrococcus furiosus*, auch “rasender Feuerball“ genannt. Er gehört zur Familie der *Thermococcaceae* und wurde erstmals am Strand von Porto di Levante auf der Insel Vulcano in Italien aus anaeroben, geothermal erhitzten Meeressedimenten isoliert. Seine optimale Wachstumstemperatur beträgt 100°C mit einer Verdopplungszeit von nur 37 Minuten. Die Zellen sind leicht unregelmäßig kokkoid, 0,8 bis 2,5 µm groß und monopolar polytrich begeißelt [Fiala und Stetter, 1986]. Sein bereits vollständig sequenziertes Genom besitzt eine Größe von ca. 1,9 Mb mit zur Zeit 2192 annotierten, putativen, offenen Leserastern [Poole *et al.*, 2005].



(a)



(b)

Abbildung I.1.: *Pyrococcus furiosus*. (a) zeigt eine Platin-bedampfte, elektronenmikroskopische (aus [Fiala und Stetter, 1986]), (b) eine animierte Aufnahme von *Pyrococcus furiosus* (von http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2010/images/Pyrococcus-1.jpg)

Pyrococcus furiosus ist ein strikt anaerober und heterotropher Organismus. Er kann somit auf den unterschiedlichsten Substraten, wie zum Beispiel Stärke, Maltose und Cellobiose, wachsen; aber auch Pyruvat kann als Energie- und Kohlenstoffquelle verwendet werden. Entstehende Stoffwechselprodukte sind hauptsächlich Acetat, Alanin, CO₂ und H₂ [Schicho *et al.*, 1993, Schönheit und Schäfer, 1995]. Toxische H₂-Konzentrationen, die zu Wachstumshemmung führen,

können durch den Zusatz von Schwefel und damit verbundener Bildung von H_2S umgangen werden [Fiala und Stetter, 1986].

2. Der Zuckermetabolismus in *Pyrococcus furiosus*

Wie viele andere Thermophile ist *P. furiosus* in der Lage auf Polysacchariden zu wachsen, jedoch findet kein Wachstum mit Glucose als Substrat statt, obwohl dieses transportiert und metabolisiert wird. Es wird daher angenommen, dass Oligosaccharide mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad in die Zelle transportiert und dort schrittweise mit Hilfe von cytoplasmatischen α - und β -Glucosidasen hydrolysiert [de Vos *et al.*, 1998] oder die Oligosaccharide bereits extrazellulär in Monomere gespalten und anschließend in die Zelle transportiert werden [VanFossen *et al.*, 2008]. Für die Zuckeraufnahme besitzt *P. furiosus* Bindeprotein-abhängige ATP binding cassette (ABC)-Transporter. Diese sind in den extremen Habitaten, denen es meist an Kohlenstoffquellen mangelt, von großem Vorteil, da sie im Gegensatz zu Sekundärtransportern eine hohe Substrataffinität aufweisen. Die dafür notwendige Energie bezieht *P. furiosus* aus der Hydrolyse von ATP [Koning *et al.*, 2002a]. Bisher sind zwei α - und ein β -Glycosid-Transporter näher beschrieben worden. β -Glycoside wie beispielsweise Cellobiose werden durch ein induzierbares, für Cellobiose hoch affines Transportsystem aufgenommen [Koning *et al.*, 2001]. Für α -Glycoside gibt es zwei bekannte Transporter (siehe Abb. I.2): zum einen einen Trehalose/Maltose (TM)-ABC-Transporter, welcher mit hoher Affinität Trehalose und Maltose, jedoch keinen anderen Zucker in die Zelle transportiert [Xavier *et al.*, 1996, Horlacher *et al.*, 1998]. Zum anderen findet sich bei *P. furiosus* ein Maltodextrin (MD)-ABC-Transporter, welcher ausschließlich Maltotriose und größere Maltooligosaccharide transportiert [Koning *et al.*, 2002b]. Die Gene, welche für die unterschiedlichen Untereinheiten der beiden Transporter kodieren, sind jeweils in Operons zusammengefasst und werden gemeinsam reguliert [Lee *et al.*, 2003]. Bei Anwesenheit des jeweiligen Substrates wird die Transkription des dazugehörigen Transporters induziert und somit die Aufnahme in die Zelle vorangetrieben [Lee *et al.*, 2006]. Auf die Zusammensetzung der Operons sowie deren Regulation wird später nochmals genauer eingegangen.

Bei glycolytischem Wachstum auf Kohlenhydraten ist als Energiemetabolismus bei *P. furiosus* ein modifizierter Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg zu finden [Schäfer und Schönheit, 1992]. Dieser ist ein im Laufe der Evolution optimierter Abbauweg, um ein Molekül Glucose in zwei Moleküle Pyruvat umzuwandeln und gleichzeitig ATP sowie Redoxäquivalente und Intermediate anzuhäufen. Der modifizierte EMP-Weg enthält unter anderem zwei neuartige ADP-abhängige Kinasen (eine Gluco- (ADP-GLK, PF0312) und eine Phosphofructokinase (ADP-PFK, PF1784)) [Kengen *et al.*, 1994, Kengen *et al.*, 1995, Tuininga *et al.*, 1999] sowie eine einzigartige Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR, PF0464). Diese wandelt in nur einem Schritt Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat um [Mukund und Adams, 1995, de Vos *et al.*, 1998]. Ein weiteres neuartiges Enzym ist die Phosphoenolpyruvat-Synthase (PEPS, PF0043) [Sakuraba und Ohshima, 2002], welche bei *P. furiosus* wahrscheinlich sowohl in der Glycolyse als auch in der Gluconeogenese verwendet wird. Ein Deletionsstamm der normalerweise in der Glycolyse verwendeten Pyruvat-Kinase (ΔPK) zeigte immer noch Wachstum auf Kohlenhydraten wohingegen eine PEPS-Deletionsmutante nicht mehr wachsen

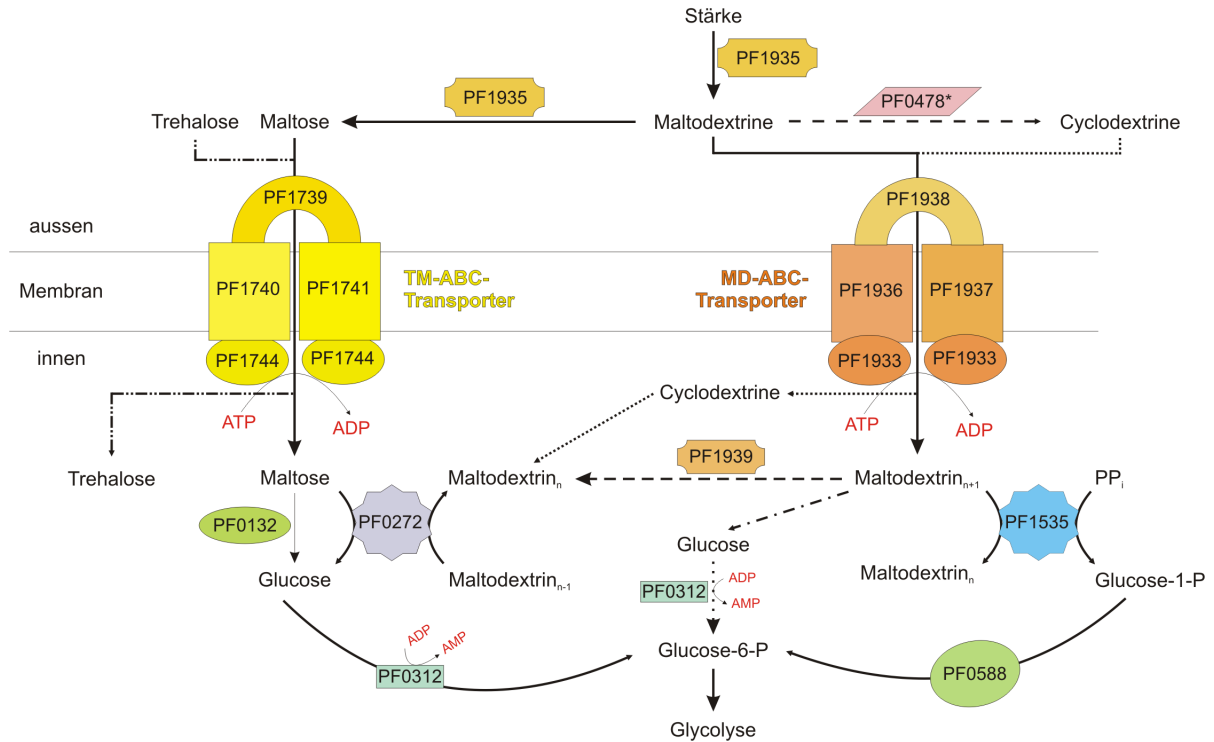


Abbildung I.2.: Schematischer Überblick zum Stärke- und Maltosemetabolismus in *Pyrococcus furiosus* (modifiziert nach [Lee *et al.*, 2006]). Abkürzungen: PF0132, α -Glucosidase; PF0272, 4- α -Glucanotransferase; PF0312, ADP-abhängige Glucokinase; PF0478, mögliche extrazelluläre Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase; PF0588, Phosphoglucose-Mutase; PF1535, α -Glucan-Phosphorylase; PF1739-PF1741, PF1744, Trehalose/Maltose-spezifischer ABC-Transporter; PF1933, PF1936-PF1938, Maltodextrin-spezifischer ABC-Transporter; PF1935, Amylopullulanase; PF1939, mögliche Maltodextrinase/Cyclodextrinase/Pullulanase

konnte [Imanaka *et al.*, 2006]. Die PEPS scheint daher für das Wachstum auf Kohlenhydraten essentiell zu sein. Kinetische Daten lassen jedoch vermuten, dass die PEPS *in vitro* eher in gluconeogenetischer Richtung arbeitet [Hutchins *et al.*, 2001]. Letztendlich wird Pyruvat durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR, PF0965-0967+PF0971) zu Acetyl-CoA decarboxyliert [Blamey und Adams, 1993] und anschließend durch eine ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (ACS I, PF1540+PF1787) zu Acetat umgewandelt [Schäfer und Schönheit, 1991, Mai und Adams, 1996, Kengen *et al.*, 1996, Bräsen *et al.*, 2008]. Folglich ergibt sich für die Oxidation von Glucose zu zwei Acetat eine Energiebilanz von zwei ATP allein durch diese letzte Reaktion. Sollte wie vermutet auch die PEPS an der Glycolyse beteiligt sein, würden sogar vier ATP entstehen. Zudem wird vermutet, dass noch 1,2 ATP aus der Reduktion von vier Ferredoxin, die während der Glycolyse durch die GAPOR- und POR-Reaktion entstanden, durch eine membrangebundene Hydrogenase (Mbh = membrane bound hydrogenase) gewonnen werden können. Die Mbh benutzt reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator und überträgt diese auf Protonen wobei H₂ gebildet wird. Diese exergonische Reaktion wird verwendet, um Ionen aus der Zelle zu pumpen. Der daraus resultierende Ionengradient wird wiederum zur ATP-Synthese verwendet [Sapra *et al.*, 2003]. Im Jahre 2007 konnte bestätigt werden, dass die A₁A₀-ATP-Synthase von *P. furiosus* Na⁺-Ionen zur Energiegewinnung verwendet [Pisa *et al.*, 2007] und es wurde die Frage aufgeworfen, welche Ionen von Mbh verlagert werden. Eine genauere

Untersuchung des Mbh-Operons zeigte, dass acht Proteine (MbhA-MbhH) codiert werden, die Ähnlichkeiten zu Untereinheiten eines Na^+/H^+ -Antiporters des Mrp-Typs (MrpB-MrpG) besitzen [Schut *et al.*, 2013]. Es wäre daher möglich, dass die Mbh von *P. furiosus* aus zwei Modulen besteht: eines mit Hydrogenaseaktivität, um einen Protonengradienten zu erstellen und das andere, um den Protonengradienten in einen Na^+ -Gradienten umzuwandeln. Der Na^+ -Gradient kann anschließend zur weiteren Gewinnung von ATP durch die A_1A_0 -ATP-Synthase verwendet werden. Die Energiekonservierung von *P. furiosus* ist schematisch in Abbildung I.3 gezeigt. Eine genaue Stöchiometrie der Reaktionen ist bisher jedoch noch unbekannt.

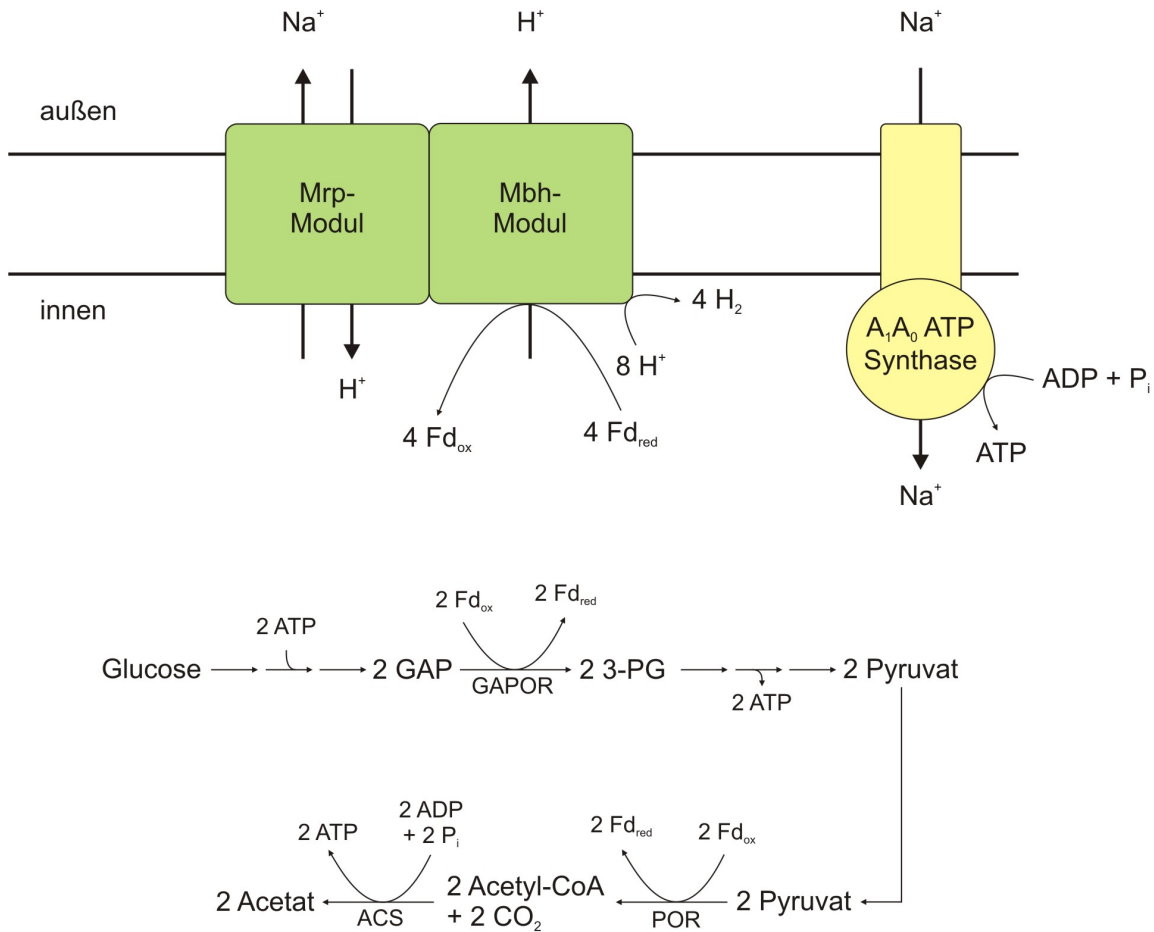


Abbildung I.3.: **Schema zur Energiekonservierung in *Pyrococcus furiosus*** (modifiziert nach [Mayer und Müller, 2014]). Bei der Energiekonservierung involvierte Enzyme sind Mbh, ein Mrp-ähnliches Na^+/H^+ -Antiportermodule und eine Na^+ -abhängige A_1A_0 -ATP-Synthase. Die Abbildung zeigt nur die gepumpten Ionen, da die Stöchiometrie der Reaktionen bisher noch unbekannt ist. Abkürzungen: GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; GAPOR, Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; 3-PG, 3-Phosphoglycerat; POR, Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; ACS, ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase; Mbh, membrangebundene Hydrogenase

Durch Enzyme, die Ferredoxin als Elektronenüberträger nutzen, entstehen zudem entweder H_2 , Alanin oder, bei Anwesenheit von Schwefel, H_2S als Endprodukte. Es wurden auch Spekulationen darüber angestellt, warum *P. furiosus* ADP anstelle von ATP benutzt. Aus thermodynamischer Sicht ist ADP nicht minderwertiger als ATP, da die Gibbs-Energie bei der Hydrolyse, zumindest

unter Standardbedingungen, vergleichbar ist. Möglicherweise ist ADP bei höheren Temperaturen einfach stabiler als ATP. Zieht man jedoch in Betracht, dass die Umsatzrate des ADP-Moleküls nur ein paar Sekunden beträgt, scheint dieses Argument eher von geringem Wert zu sein. Andererseits könnte die Verwendung von ADP vorteilhaft sein, um *P. furiosus* nach Hungerperioden ein erneutes Wachstum zu ermöglichen. Unter diesen Bedingungen könnte das ATP-Level auf einen geringen Wert gesunken sein und dennoch wäre der Organismus in der Lage, Glucose über ADP zu phosphorylieren [Kengen *et al.*, 1996]. Auch für die Verwendung von Ferredoxin als Elektronenüberträger ist die erhöhte Thermostabilität gegenüber Pyridinnukleotiden diskutiert worden. Gesicherte Daten dazu gibt es jedoch nicht. Stattdessen wird vermutet, dass beide gleichermaßen Verwendung finden und eine Ferredoxin:NADP-Oxidoreduktase zwischen beiden Elektronenüberträgern vermittelt [Kengen *et al.*, 1996, Daniel und Danson, 1995].

Der erste und gleichzeitig irreversible Schritt der Glycolyse ist die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch eine ADP-abhängige Glucokinase (ADP-GLK, PF0312), wobei ein Molekül ADP zu AMP dephosphoryliert wird. Anschließend wird Glucose-6-Phosphat durch eine Phosphoglucose-Isomerase (cPGI, PF0196), welche zur Cupin-Superfamilie gehört, in Fructose-6-Phosphat umgewandelt. Der nächste Schritt ist die ADP-abhängige Umwandlung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat und AMP mithilfe einer Phosphofructokinase (ADP-PFK, PF1784). Auch dieser Schritt ist irreversibel und ein wichtiger Richtungspunkt in der Glycolyse. Die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (FBPA IA, PF1956) spaltet anschließend das entstandene Fructose-1,6-Bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). Mithilfe der Triosephosphat-Isomerase (TIM, PF1920) wird DHAP ebenfalls in GAP überführt. Im klassischen EMP-Weg der *Eucarya* und *Bacteria* würde an dieser Stelle nun eine Umsetzung von GAP über 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) zu 3-Phosphoglycerat (3-PG) mit Hilfe von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase stattfinden. In *P. furiosus* wird diese Oxidation jedoch in einem irreversiblen Schritt katalysiert, ohne die Bildung von 1,3-BPG und ATP. Dafür besitzt *P. furiosus* an dieser Stelle der Glycolyse zwei Enzyme. Zum einen die Ferredoxin-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR, PF0464), die GAP in 3-PG und reduziertes Ferredoxin umwandelt; zum anderen die NAD(P)⁺-abhängige, nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPN, PF0755), welche die Umwandlung von GAP in 3-PG, NAD(P)H und H⁺ katalysiert. Das durch die GAPOR gebildete Ferredoxin ist unter anaeroben Bedingungen für die Energieproduktion unentbehrlich, wohingegen das von der GAPN gebildete NAD(P)H für anabole Zwecke gebraucht wird. Eine Phosphoglycerat-Mutase (iPGAM, PF1959) wandelt 3-Phosphoglycerat anschließend in 2-Phosphoglycerat um. Im nächsten Schritt wird durch eine Enolase (ENO, PF0215) unter Abspaltung von Wasser 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt. Der letzte wiederum irreversible Schritt der Glycolyse wird von einer Pyruvat-Kinase (PK, PF1188) katalysiert. Dabei wird Phosphoenolpyruvat mit Hilfe von ADP zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Für *P. furiosus* wird in letzter Zeit jedoch immer öfter spekuliert, ob an dieser Stelle ebenfalls die Phosphoenolpyruvat-Synthase (PEPS, PF0043) bei der Energiegewinnung behilflich ist. Deren Enzymreaktion besitzt zwar eine Gibbs-Energie nahe Null und ist somit reversibel, sie zeigt jedoch eine deutliche Präferenz für die gluconeogenetische Richtung [Hutchins *et al.*, 2001, Bräsen *et al.*, 2014].

Neben Kohlenhydraten kann *P. furiosus* auch auf Pyruvat wachsen und bei Anwesenheit von elementarem Schwefel auch Pepton und Peptide als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Dabei werden sogar Peptide gegenüber Maltose bevorzugt verstoffwechselt [Schäfer und Schönheit, 1991, Adams *et al.*, 2001]. Als Energiemetabolismus verwendet *P. furiosus* unter diesen Bedingungen die Gluconeogenese, um Glucose-6-Phosphat aus Pyruvat zu erzeugen. Die Gluconeogenese stellt auch bei *P. furiosus* bis auf drei irreversible Schritte eine Umkehrung des EMP-Weges dar [Schäfer und Schönheit, 1993, Verhees *et al.*, 2003]. Sie beginnt zunächst mit der reversiblen Umsetzung von Pyruvat und ATP zu Phosphoenolpyruvat und $\text{AMP} + \text{P}_i$ mit Hilfe einer Phosphoenolpyruvat-Synthase (PEPS, PF0043) [Imanaka *et al.*, 2006], welche möglicherweise, wie bereits oben erwähnt, auch in der Glycolyse tätig ist. Bei der Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat stößt man jedoch auf eine „Besonderheit“. Während die Umsetzung in der Glycolyse in nur einem Schritt erfolgt, ist in der Gluconeogenese eine Umsetzung in zwei Schritten erforderlich. Dies entspricht den normalerweise durchgeführten Schritten mit gleichen Enzymen wie in der klassischen Glycolyse von Bakterien und Eukaryoten. Bei *P. furiosus* und den meisten Archaeen agieren diese Enzyme jedoch ausschließlich gluconeogenetisch [Matsubara *et al.*, 2011]. Der erste Schritt wird von einer Phosphoglycerat-Kinase (PGK, PF1057) katalysiert. Hierbei wird 3-Phosphoglycerat mit Hilfe von ATP in 1,3-Bisphosphoglycerat umgewandelt. Dieses wird jedoch sofort von einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, PF1874) mit $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und $\text{NAD(P)}^+ + \text{P}_i$ umgesetzt. Der letzte Unterschied in den beiden Metabolismen besteht in der Umsetzung zu Fructose-6-Phosphat durch eine Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase (FBPase, PF0613). In früheren Studien wurde diese als Phosphatase der Klasse IV, welche sowohl eine FBPase- als auch eine Inositol-Monophosphatase-Aktivität besitzt, eingeordnet [Verhees *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2004]. Neuere Studien über eine FBPase in *T. kodakarensis* KOD1 (TK2164), welche eine 88%ige Homologie zur FBPase in *P. furiosus* besitzt, konnten diese nun als Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase charakterisieren. Deshalb wird nun davon ausgegangen, dass das Enzym in *P. furiosus* die gleiche Funktion besitzt. Das besondere an diesem Enzym ist, dass es sowohl die Aldolkondensation von GAP und DHAP zu Fructose-1,6-Bisphosphat als auch dessen anschließende Dephosphorylierung zu Fructose-6-Phosphat katalysiert [Say und Fuchs, 2010]. Das Fructose-1,6-Bisphosphat-Intermediat wird während der Katalyse jedoch nicht freigesetzt. Die Bifunktionalität der FBPase garantiert die schnelle Umsetzung von hitzelabilen Triosephosphaten zu stabilem Fructose-6-Phosphat und macht diesen Schritt somit unidirektional. Dies könnte zudem eine Thermoadaptation des Organismus darstellen. Aufgrund von Funktion und Verteilung des Enzyms sowie seiner phylogenetischen Zugehörigkeit wurde deshalb darüber spekuliert, ob es eines der ursprünglichen Schrittmacher der Gluconeogenese sein könnte [Say und Fuchs, 2010, Du *et al.*, 2011]. Ein schematischer Überblick über den zentralen Kohlenhydratmetabolismus von *P. furiosus* ist in Abb. I.4 gegeben.

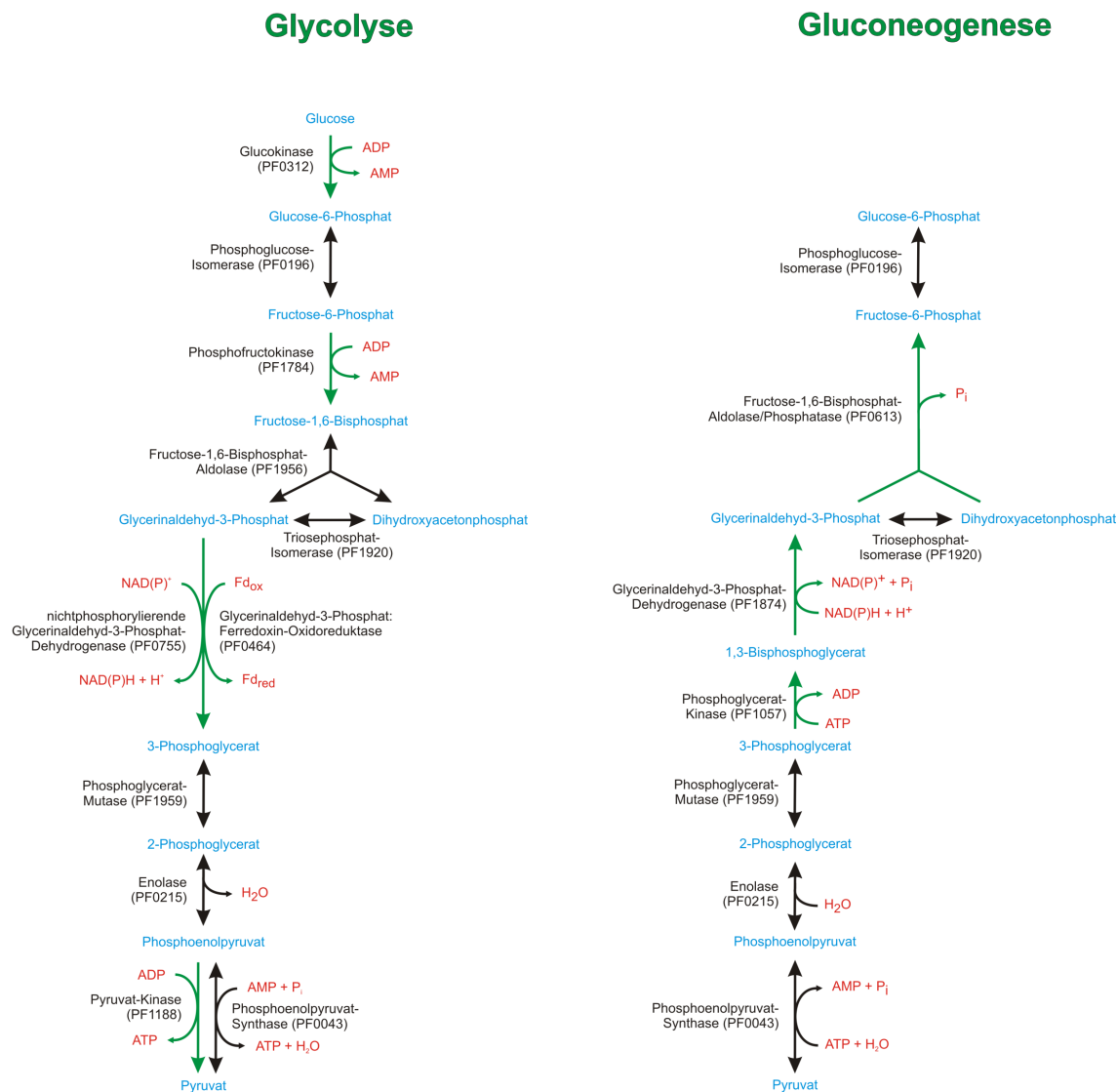


Abbildung I.4.: Schematischer Überblick zur Glycolyse und Gluconeogenese in *Pyrococcus furiosus*. Als Glycolyse (links) benutzt *P. furiosus* einen modifizierten EMP-Weg. Die Gluconeogenese (rechts) stellt bis auf ein paar irreversible Schritte, welche durch spezifische gluconeogenetische Enzyme katalysiert werden, eine Umkehrung der Glycolyse dar. Grüne Pfeile bezeichnen die jeweils irreversiblen Schritte. (modifiziert nach [Verhees *et al.*, 2003, Siebers und Schönheit, 2005, Bräsen *et al.*, 2014])

3. Archaeelle Transkription und ihre Regulation

Die Transkription von DNA in RNA und ihre Regulation sind sehr bedeutende biologische Prozesse [Soppa, 1999]. Beim Vergleich der verschiedenen Transkriptionsmaschinerien von Prokaryoten und Eukaryoten miteinander lassen sich einige Gemeinsamkeiten, aber auch grundlegende Unterschiede feststellen. Die Archaeen nehmen in Bezug auf die Transkription eine Zwischenstellung ein, da sie sowohl bakterielle als auch eukaryotische Komponenten besitzen. Im Gegensatz zu Eukaryoten, welche drei bis fünf verschiedene Typen an RNA-Polymerasen (RNAP) besitzen, haben Archaeen und Bakterien nur eine RNAP. Zudem besteht die bakterielle RNAP lediglich aus vier Untereinheiten.

Bei näherer Betrachtung der RNAPs von Archaeen und Eukaryoten hingegen stellt man eine große Ähnlichkeit der beiden Enzyme fest. Vor allem die eukaryotische RNAP II ähnelt in ihrem Aufbau sehr stark der archaeellen Version [Zillig *et al.*, 1979, Huet *et al.*, 1983]. Beide bestehen aus 10-12 Untereinheiten, die zum Teil hoch konserviert vorliegen, und sind daher ähnlich komplex aufgebaut [Thomm, 1996]. Außerdem kann man in beiden Domänen die Transkriptionsfaktoren TATA-Box Bindeprotein (TBP) und Transkriptionsfaktor B (TFB) wiederfinden, welche sowohl in funktioneller als auch struktureller Hinsicht homolog zueinander sind [Hausner *et al.*, 1996, Ouhammouch *et al.*, 2003]. Die Regulation der Transkription an sich ähnelt jedoch mehr dem prokaryotischen System.

Wirft man einen genaueren Blick auf die Promotorelemente, erkennt man bereits dort erste fundamentale Unterschiede in den einzelnen Phyla. Bei den *Bacteria* besteht der Promotor aus einer -35-Box und der Pribnov-Box, die sich 10 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts befindet [Soppa, 1999]. Im Gegensatz dazu stehen der eukaryotische und der archaeelle Promotor, welche nahezu identisch aus drei Elementen aufgebaut sind. Beide besitzen ein Transcription Factor B Recognition Element (BRE), welches aus zwei Adeninen besteht und -34/-33 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts (+1) zu finden ist [Littlefield *et al.*, 1999, Soppa, 1999]. Einige Basenpaare stromabwärts des BRE findet man die TATA-Box (-27/-26) sowie auf Höhe des Transkriptionsstarts ein sogenanntes Initiatorelement (INR), welches meist aus einem Pyrimidin-Purin-Dinukleotid besteht [Thomm und Wich, 1988, Reiter *et al.*, 1990, Hausner *et al.*, 1991, Soppa, 1999].

Auch bei der Initiation der Transkription lassen sich grundlegende Unterschiede erkennen. Die bakterielle RNAP beispielsweise erkennt Promotoren mit Hilfe sogenannter Sigma-Faktoren. Sie werden zunächst an die Polymerase gebunden und erleichtern anschließend die Promotorerkennung [Busby und Ebright, 1994]. Weitere Transkriptionsfaktoren zur Initiation sind bei Bakterien nicht notwendig. Bei den Eukaryoten und Archaeen hingegen übernehmen die Transkriptionsinitiationsfaktoren TBP und TFB diese Arbeit. Der erste Schritt der archaeellen Transkriptionsinitiation besteht aus der Bindung des sattelförmigen TBPs an acht Basenpaare auf Höhe der TATA-Box, wodurch es zu einer Biegung der DNA kommt. Zudem interkalieren vier Phenylalanine zwischen die ersten und letzten zwei Basenpaare der TATA-Box, und die sechs zentralen Basenpaare werden durch die Bindung stark entzerrt. Die DNA-Konformation wandelt sich von einer B- in eine Form von A-DNA [Soppa, 1999]. Anschließend bindet TFB in Höhe des BRE an den bereits vorhandenen TBP-DNA-Komplex und stabilisiert diesen durch spezifische Wechselwirkungen mit TBP und der Promotor-DNA [Hausner *et al.*, 1996]. Die Wechselwirkung zwischen BRE und TFB bestimmt dabei die Orientierung des Initiationskomplexes sowie die Richtung der Transkription [Hausner und Thomm, 2001]. Der binäre Präinitiationskomplex aus TBP und TFB dient im Folgenden als Grundlage für die Rekrutierung der RNAP, durch deren Anlagerung ein stabiler Initiationskomplex entsteht. Für *in vitro* Versuche sind nur diese drei Komponenten für eine funktionierende Transkription nötig. *In vivo* jedoch wird zusätzlich der Transkriptionsfaktor TFE hinzugezogen. Dieser stabilisiert den offenen Komplex durch direkte Wechselwirkung mit TBP, der RNAP und der DNA am nicht-transkribierten Strang [Grünberg *et al.*, 2007] (siehe Abb. I.5).

Obwohl der Transkriptionsmechanismus und die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren der Archaeen beinahe eine vereinfachte Form des eukaryotischen Systems darstellen [Thomm, 1996], ist der Regulationsmechanismus an sich eher dem bakteriellen System zuzuordnen. Bisher ist in Archaeen nur sehr wenig über die Interaktion von Transkriptionsregulatoren mit dem basalen Transkriptionsapparat bekannt. Die meisten Proteine, die an DNA binden und eine bekannte genregulierende Funktion ausüben, sind homolog zu bakteriellen Aktivatoren oder Repressoren [Kyrpides und Ouzounis, 1999]. Nur eine Hand voll ähnelt den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren [Aravind und Koonin, 1999, Bell und Jackson, 2001]. Wie genau die „bakterien-ähnlichen“ Regulatoren mit der „eukaryoten-ähnlichen“ basalen Transkriptionsmaschinerie der Archaeen wechselwirken, ist immer noch umstritten [Di Fiore *et al.*, 2009].

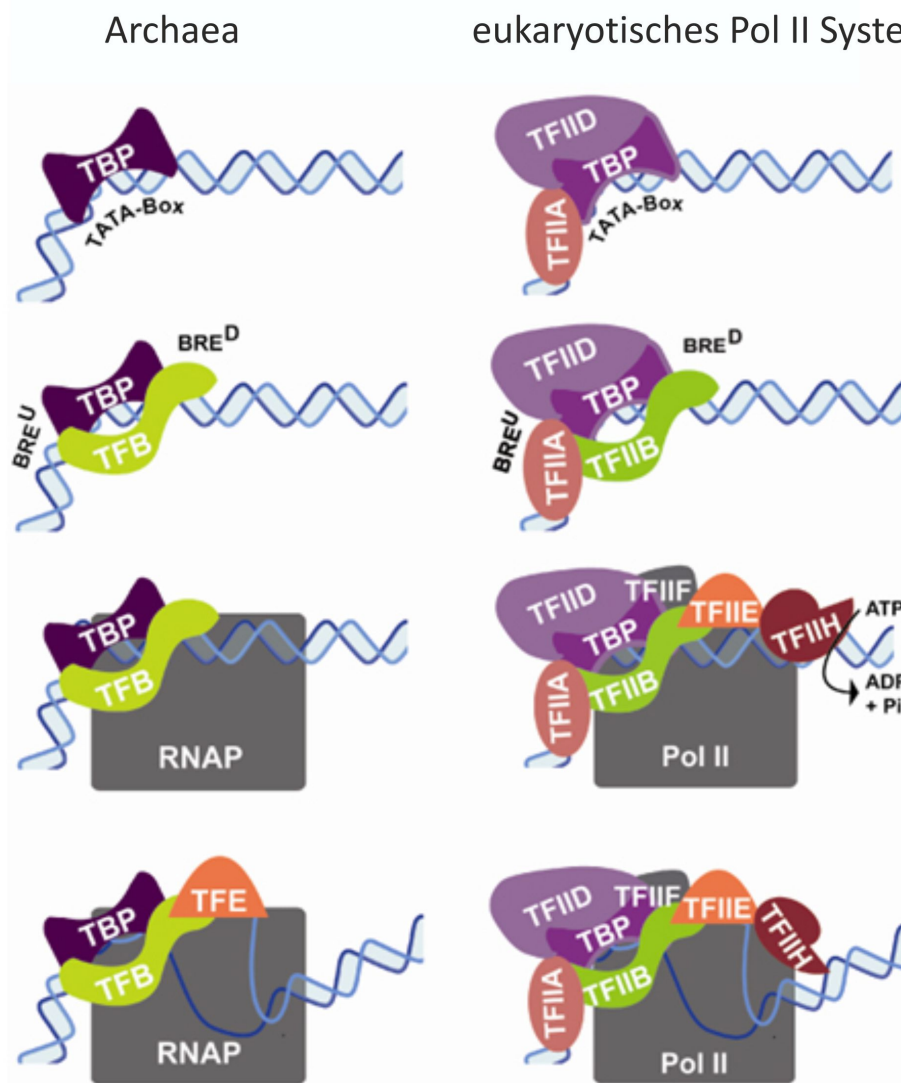


Abbildung I.5.: **Transkriptionsinitiation in Archaeen und Eukaryoten** (modifiziert nach [Zeller, 2011]). Erklärung siehe Text.

4. Transkriptionsregulatoren der TrmB-Familie

Die meisten der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren sind Repressoren. Aber auch Aktivator-
en oder Proteine, die beide Aktivitäten ausführen können, sind bekannt [Bell, 2005, Geiduschek
und Ouhammouch, 2005, Grohmann und Werner, 2011, Peeters *et al.*, 2013]. Eine Familie, die
alle drei Kombinationen an Transkriptionsfaktoren enthält, ist die TrmB-Familie (transcriptional
regulator of the maltose system). Bei diesen Transkriptionsregulatoren handelt es sich um weit
verbreitete Proteine, die in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden können. Meist
bestehen sie aus einer DNA-Bindedomäne (DBD) (Pfam-ID: PF01978) und/oder einer Effektor-
Bindedomäne (EBD) (Pfam-ID: PF11495) [Maruyama *et al.*, 2011]. Die DBD wird zumeist von
einem Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv gebildet, welches zu den am häufigsten vorkommenden
Motiven unter den Bakterien und Archaeen zählt [Pérez-Rueda und Janga, 2010]. Proteine, die
sowohl eine DBD als auch eine EBD besitzen, findet man jedoch häufiger in Archaeen. Die
meisten Proteine der TrmB-Familie findet man in Euryarchaeoten, aber es existieren auch einige
in den Crenarchaeoten sowie jeweils ein Vertreter in den neueren Phyla Thaum-, Nano- und
Korarchaeen [Maruyama *et al.*, 2011].

In Euryarchaeoten können Proteine der TrmB-Familie in 13 Genera gefunden werden. Vor
allem in den Ordnungen *Thermococcales*, *Halobacteriales* und *Thermoplasmatales* findet man
die meisten Vertreter in den Genomen, insgesamt 41 Stück [Maruyama *et al.*, 2011]. In den
thermophilen Archaeen sind sie hauptsächlich in der Regulation des Zuckerstoffwechsels invol-
viert, vor allem in der Maltose- und Glucoseverarbeitung [Van De Werken *et al.*, 2006, Kanai
et al., 2007, Lee *et al.*, 2008]. Der Genlocus, der für TrmB codiert, wird zudem von Genen
flankiert, welche für einen Maltose- und/oder Trehalasetransporter codieren. Im Gegensatz dazu
besitzt die halobakterielle Version VNG1451C aus *Halobacterium salinarum* [Schmid *et al.*,
2009] oder MreA, der Regulator der Methanogenese in *Methanosarcina acetivorans* [Reichlen
et al., 2012], keine umliegenden Transportergene. In den letzten Jahren wurden immer mehr
TrmB-ähnliche Proteine in Archaeen entdeckt, und es scheint so, als ob sie eine wichtige Rolle
in verschiedenen metabolischen Prozessen spielen. Erste Forschungen deuten darauf hin, dass
TrmB in einem dieser Organismen entstand und später via horizontalem Gentransfer auf andere
Archaeen und/oder Bakterien verteilt wurde [DiRuggiero *et al.*, 2000].

In dieser Arbeit wird nur auf die TrmBs der Ordnung *Thermococcales*, die zuckerspezifisch
die Transkription bestimmter Gene an- bzw. abschalten, näher eingegangen. Gefunden und
beschrieben wurden die Vertreter der TrmB-Familie erstmals im Jahre 2003 [Lee *et al.*, 2003]. Van
De Werken *et al.* entdeckten später auch ein konserviertes Sequenzmotiv in *P. furiosus*, an das
TrmBL1 bindet [Van De Werken *et al.*, 2006]. Dieses konnte in der Promotorregion von Genen
identifiziert werden, welche für Enzyme der Glycolyse und Gluconeogenese kodieren. Deshalb
wurde es auch als Thermococcales Glycolytic Motif, kurz TGM, bezeichnet und weist somit auf
eine gemeinsame Regulation der betreffenden Gene auf Transkriptionsebene hin. Das TGM an
sich besteht aus einer palindromischen Konsensussequenz “TATCAC-N₅-GTGATA“ und kann
nur in *P. furiosus* und *Thermococcus kodakarensis* gefunden werden. Da *T. kodakarensis* jedoch
kein TrmB besitzt, mussten noch weitere Vertreter dieser Familie vorhanden sein. Aus diesem

Grund wurden Sequenzanalysen mit einigen Vertretern der Ordnung *Thermococcales* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass bei den *Thermococcales* fünf verschiedene TrmBs vorhanden sind (siehe Abb. I.6). Vier davon können auch in *P. furiosus* gefunden werden [Lee *et al.*, 2007a].

	TrmB	TrmBL1	TrmBL2	TrmBL3	TrmBL4
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PH1743	PF0124	PF0496	PF0661	-
<i>Thermococcus litoralis</i>	Q7LYW4 (100 %)	-	-	-	-
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	-	TK1769 (67 %)	TK0471 (82 %)	-	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	PH1034 (71 %)	-	PH0799 (92 %)	-	PH0751
<i>Pyrococcus abyssi</i>	-	-	PAB0838 (91 %)	-	-

Abbildung I.6.: **Verteilung von Proteinen der TrmB-Familie in verschiedenen *Thermococcales*.** Die Proteine sind mit ihrem jeweiligen Gennamen angegeben. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz im Vergleich zum korrespondierenden Protein in *P. furiosus* ist in Prozent angegeben. Fehlt das betreffende Protein in diesem Organismus, steht dort ein Minuszeichen. Die Ähnlichkeit der verschiedenen Paraloga liegt zwischen 22 % und 30 % (modifiziert nach [Lee *et al.*, 2007a]).

Mittlerweile sind viele weitere Genome sequenziert worden und auch die Mitglieder der TrmB-Familie sind angewachsen. Robert Reichelt erstellte in seiner Dissertation deshalb einen neuen TrmB-Stammbaum, in dem er jedoch nur die wHTH-Domäne der 87 bisher sequenzierten TrmB-Proteine der *Thermococcales* verwendete, da diese in allen Proteinen vorliegt. Der Stammbaum konnte in 11 TrmB/TrmBL-Cluster mit 75 Proteinen unterteilt werden. 12 Proteine konnten nicht zugeordnet werden und blieben unklassifiziert. Die Einteilung korrelierte dabei mit der früheren, die nur fünf TrmB/TrmBL-Cluster besaß [Lee *et al.*, 2007a]. Der Stammbaum von Robert Reichelt listete zudem noch 5 weitere TrmBL-Proteine in *P. furiosus*, welche in der früheren Einteilung aufgrund von Komplettssequenzanalysen der Proteine nicht in Erscheinung traten. Bei den neuen TrmBL-Proteinen handelt es sich um eine DEXX-box ATPase (PF0635), einen vermeintlichen Transkriptionsregulator mit HTH-Motiv (PF0055) und drei hypothetische Proteine (PF0649, PF0709 und PF2062). Bisher ist jedoch keines der Proteine näher charakterisiert worden.

Die Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 werden in den folgenden Abschnitten näher behandelt (siehe Kapitel 4.1 und 4.2), da in dieser Arbeit hauptsächlich mit diesen Regulatoren gearbeitet wurde. Über die Transkriptionsregulatoren TrmBL2 und TrmBL3 ist bisher nur sehr wenig bekannt. Beide Proteine setzen sich aus 264 Aminosäuren zusammen und haben ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Am N-Terminus befindet sich bei beiden Proteinen die DNA-Bindedomäne mit Tyrosin an Position 50 als hochkonservierte DNA-bindende Aminosäure. Zudem fehlt beiden Proteinen eine C-terminale Zuckerbindedomäne. Über TrmBL2 ist zudem noch bekannt, dass es relativ unspezifisch an DNA binden kann [Waege, 2014]. Es wird ihm eine Art Histonfunktion ähnlich zu seinem Homolog TK0471 aus *T. kodakarensis* zugeschrieben, welches die DNA zu dicken, faserigen Strukturen verklebt [Maruyama *et al.*, 2011]. Das Protein TrmBL4 kommt nur in *Pyrococcus horikoshii* vor und ist ebenfalls weitestgehend unbekannt.

4.1. Der Transkriptionsregulator TrmB

Der Transkriptionsregulator TrmB wurde erstmals im hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus litoralis* beschrieben [Xavier *et al.*, 1996]. Dort agiert er als zuckerspezifischer Repressor für Gene des Trehalose/Maltose (TM)-Operons. Dieses Operon beinhaltet neben den verschiedenen Untereinheiten des Trehalose/Maltose-spezifischen ABC-Transporters sowie Trehalose-metabolisierenden Enzymen auch das Gen für TrmB (OCC_05836) [Lee *et al.*, 2003]. Die Anwesenheit von TrmB in *P. furiosus* selbst scheint das Resultat von lateralem Gentransfer zwischen *T. litoralis* und *P. furiosus* zu sein [Imamura *et al.*, 2004]. Das TM-Operon befindet sich bei *T. litoralis* in einer 16 kb Region, die von nur noch einem IS-Element flankiert wird [DiRuggiero *et al.*, 2000]. Der Cluster an sich besitzt eine nahezu identische Sequenz zum TM-Operon von *P. furiosus*. Er besteht aus den sechs Genen *malE*, *malF*, *malG*, *treT*, *trmB* und *malK* [Horlacher *et al.*, 1998] (siehe Abb. I.7, a). *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass TrmB den *malE*-Promotor an einer stromaufwärts der BRE/TATA-Box gelegenen pseudopalindromen Sequenz (**TACTTTTAGTA**) erkennt und daran bindet [Lee *et al.*, 2003] (siehe Abb. I.8, a).

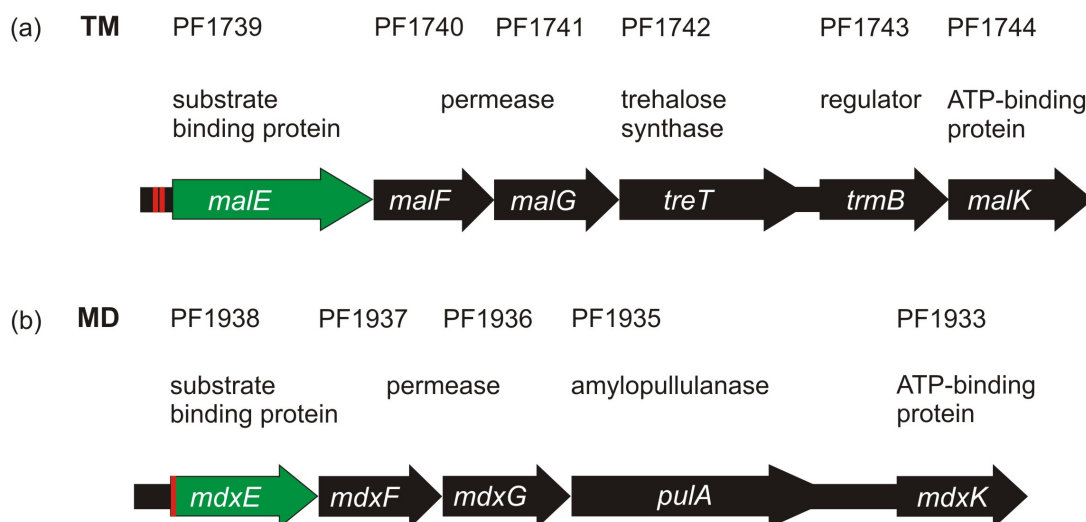


Abbildung I.7.: **Gencluster des Trehalose/Maltose (TM)- und des Maltodextrin (MD)-Operons von *P. furiosus*.** (a) Abgebildet ist der TM-Gencluster, welcher für einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter von Trehalose und Maltose, sowie für eine Trehalose-Synthase und das Regulatorprotein TrmB codiert. Die roten Linien markieren die palindromische Bindesequenz von TrmB (TACTN₃AGTA) in der Promotorregion von *malE*. Darunter ist der MD-Gencluster abgebildet (b), welcher für einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter von Maltodextrinen sowie für eine Amylopullulanase codiert. Ein separater Regulator fehlt in diesem Operon. Die rote Linie stellt die erste Hälfte der palindromen Bindesequenz (TACT) von TrmB dar (modifiziert nach [Lee *et al.*, 2008]).

Betrachtet man das Genom von *P. furiosus* etwas genauer, kann man feststellen, dass sich dort noch ein zweiter Gencluster befindet, der für einen Maltotriose-spezifischen ABC-Transporter sowie für Maltodextrin-metabolisierende Enzyme codiert. Dieser Cluster wird MD-Operon genannt und ist ebenfalls in *T. litoralis* zu finden. Er besteht aus den Genen *mdxE*, *mdxF*, *mdxG*, *pula* und *mdxK* [Koning *et al.*, 2002b] (siehe Abb. I.7, b). Ein spezifischer Regulator ist jedoch nicht zu finden [Krug *et al.*, 2013]. DNA-Sequenzvergleiche bestätigten, dass *malK* das Resultat

einer Verdoppelung des *mdxE*-Gens war, bevor der gesamte *mal*-Gencluster von *T. litoralis* auf *P. furiosus* übertragen wurde [Imamura *et al.*, 2004]. Im Gegensatz zum *malE*-Promotor des TM-Operons enthält der *mdxE*-Promotor des MD-Operons nur die erste Hälfte der TrmB-Erkennungssequenz (TACT) am Transkriptionsstart. Die zweite Hälfte des inverted repeat fehlt gänzlich (siehe Abb. I.8, b).



Abbildung I.8.: **Aufbau des *malE* (TM)- und des *mdxE* (MD)-Promotors von *P. furiosus*.** (a) zeigt die Promotorregion des *malE*- (b) die Promotorregion des *mdxE*-Gens. Die Bindestelle von TrmB ist fett gedruckt. Das palindromische Erkennungsmotiv ist unterstrichen. Das BRE sowie die TATA-Box sind grün eingrahmt. Der Transkriptionsstart ist in rot mit +1 dargestellt. Das TGM, welches nur am *mdxE*-Promotor vorhanden ist, wurde blau umrandet (modifiziert nach [Lee *et al.*, 2008]).

In vitro Transkriptionen konnten eine verminderte Bindungsaffinität von TrmB am *mdxE*-Promotor bestätigen. Der *malE*-Promotor wird bereits ab 0,2 μ M TrmB reprimiert, wohingegen am *mdxE*-Promotor 1,6 μ M TrmB für eine komplette Repression benötigt werden [Lee *et al.*, 2005]. Die Bindeaffinität von TrmB wird zudem von verschiedenen Zuckern beeinflusst. TrmB ist in der Lage Maltose, Sucrose, Maltotriose, Maltodextrine und Trehalose mit absteigender Affinität zu binden. Durch Zugabe von Maltose oder Trehalose löst sich TrmB vom TM-Promotor, und die Transkription kann starten. Bindet jedoch Sucrose oder Maltotriose an TrmB, findet keine Ablösung von der DNA statt. Im Falle des MD-Promotors verläuft die Induktion genau anders herum. In Anwesenheit von Maltotriose, Maltodextrinen oder Sucrose löst sich TrmB vom MD-Promotor, wohingegen die Zugabe von Maltose oder Trehalose keinen Effekt auf die TrmB-Bindung besitzt [Lee *et al.*, 2005]. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Glucose ebenfalls von TrmB gebunden wird. Diese wirkt als Co-Repressor am TM- und MD-Operon und führt in Anwesenheit von Maltose oder Maltotriose zu verstärkter Repression [Lee *et al.*, 2007b].

TrmB selbst besteht aus 338 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 38,8 kDa. Bei Raumtemperatur tritt es hauptsächlich als Dimer auf [Lee *et al.*, 2003]. Das Protein setzt sich aus einer N-terminalen DBD und einer C-terminalen EBD zusammen. Dazwischen liegt eine coiled-coil (CC)-Helix, welche eine Dimerisierung begünstigt (siehe Abb. I.9).

Am N-Terminus ist ein winged-HTH-Motiv zu finden, das aus vier α -Helices D α 1- α 4 und zwei β -Faltblättern D β 1- β 2 besteht. Durch die D α 4-Helix, welche für die DNA-Erkennung benötigt wird, und deren Dimer-Pendant D α 4' kann TrmB an zwei aufeinanderfolgende große Furchen

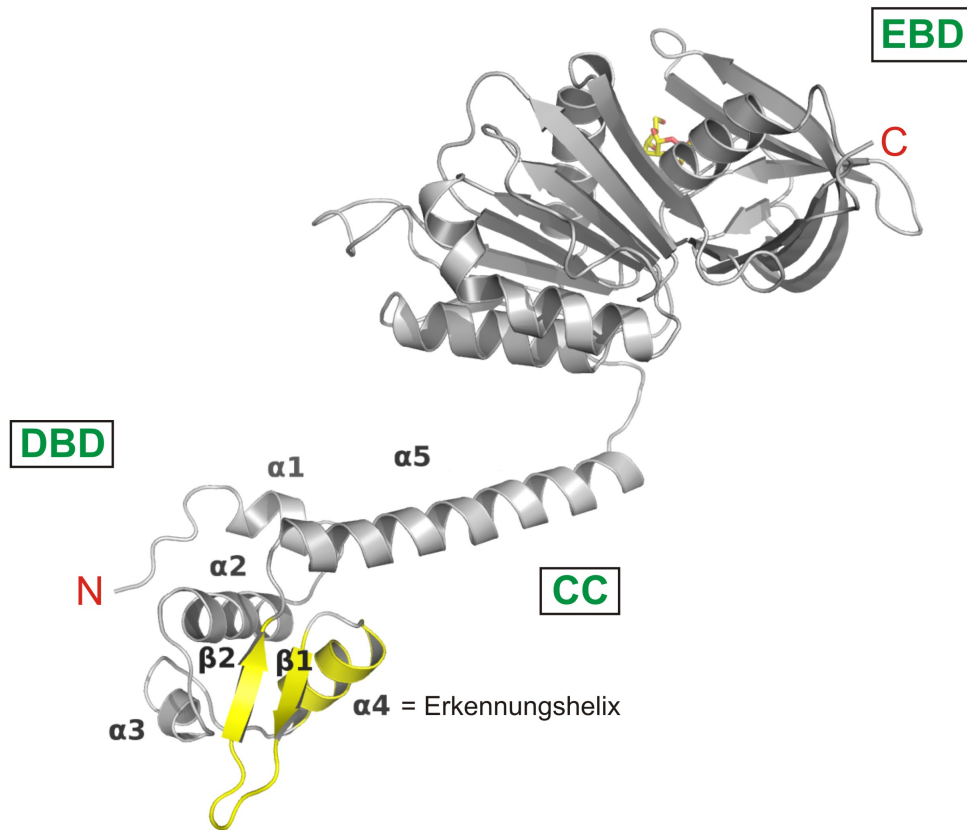


Abbildung I.9.: Gesamtstruktur eines TrmB-Monomers von *P. furiosus*. Das Monomer besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne (DBD), einer amphipathischen Helix mit einem coiled coil-Motiv (CC) zur Dimerisierung und einer C-terminalen Effektor-Bindedomäne (EBD) (aus [Krug *et al.*, 2013]).

einer B-DNA binden [Krug *et al.*, 2013]. Vor allem Tyrosin an Position 50 und in geringerem Maße Aspartat an Position 51 scheinen eine wichtige Rolle bezüglich der DNA-Bindung zu spielen [Lee *et al.*, 2007b]. Auf das wHTH-Motiv folgt eine amphipathische Helix $\alpha 5$, die ein CC-Motiv enthält. Dieses besteht vor allem aus hydrophoben Aminosäuren, welche mit den korrespondierenden Partnern eines zweiten Monomers Wechselwirkungen eingehen (Phe81/Ile91', Phe84/Leu88', Leu88/Phe84' und Ile91/Phe81') und somit die Dimerbildung unterstützen [Krug *et al.*, 2013] (siehe Abb. I.10).

Der C-Terminus, der die EBD enthält, besteht aus zwei Teilbereichen. Der erste Teilbereich wird von acht β -Faltblättern E β 1-8 gebildet. Diese werden von zwei großen Helices E α 1-2 auf der einen sowie einer großen Helix E α 3, die das β -Faltblatt kreuzt, auf der anderen Seite eingerahmt. Der zweite Teilbereich, der mit dem ersten über ein kurzes Gelenk verbunden ist, bildet zunächst ein Faltblatt E β 9, dann eine Helix E α 4 und anschließend eine unregelmäßig abgeflachte β -Faßstruktur aus sieben β -Faltblättern. Die Achse dieser Faßstruktur befindet sich parallel zu den Faltblättern des ersten Teilbereiches [Krug *et al.*, 2006]. Die Zuckererkennungshelix E α 3 ist oberhalb der Spalte zwischen den beiden Teilbereichen zu finden. Dabei spielt es keine Rolle, ob Maltose oder Sucrose gebunden vorliegt. Ihre nichtreduzierenden Glycosylgruppen interagieren beide mit denselben sechs Aminosäuren des zweiten C-terminalen Teilbereiches – Asn₃₀₅, Gly₃₂₀,

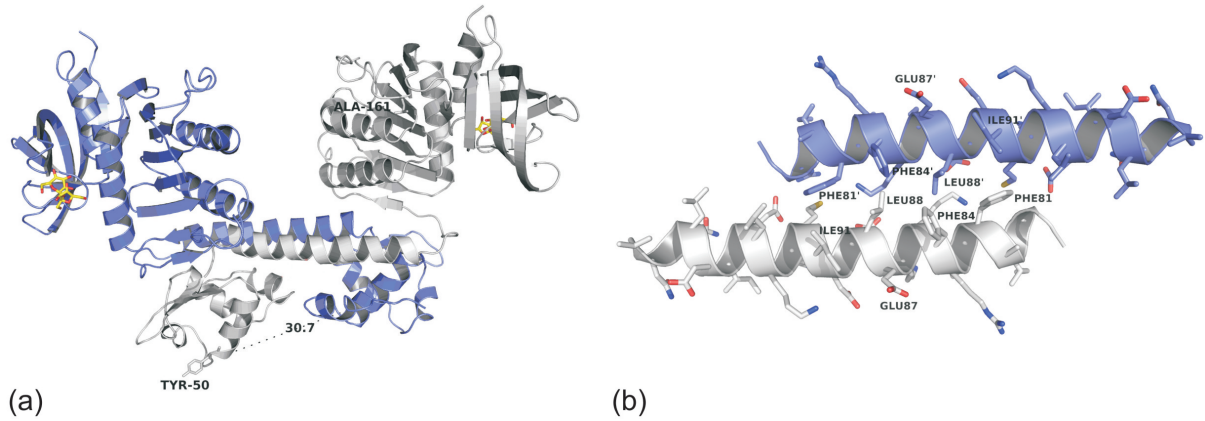


Abbildung I.10.: **TrmB als Dimer sowie seine CC-Helix.** (a) Abgebildet ist TrmB als Dimer mit gebundener Sucrose und Tyrosin-50 als DNA-bindende Aminosäure. (b) zeigt die beiden CC-Helices eines Dimers sowie die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren (aus [Krug *et al.*, 2013]).

Met₃₂₁, Val₃₂₄, Ile₃₂₅ und Glu₃₂₆. Der einzige Unterschied besteht bezüglich der Orientierung von Maltose oder Sucrose in gebundenem Zustand. Zudem wechselwirken die nichtreduzierten Glycosylgruppen von Maltose über Wasserstoffbrückenbindungen mit einer siebten Aminosäure – Ser₂₂₉ –, welche sich in der Zuckererkennungshelix E α 3 befindet. Letztendlich konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Fructosylgruppen von Sucrose auf ähnliche Weise agieren oder nicht [Krug *et al.*, 2013] (siehe Abb. I.11).

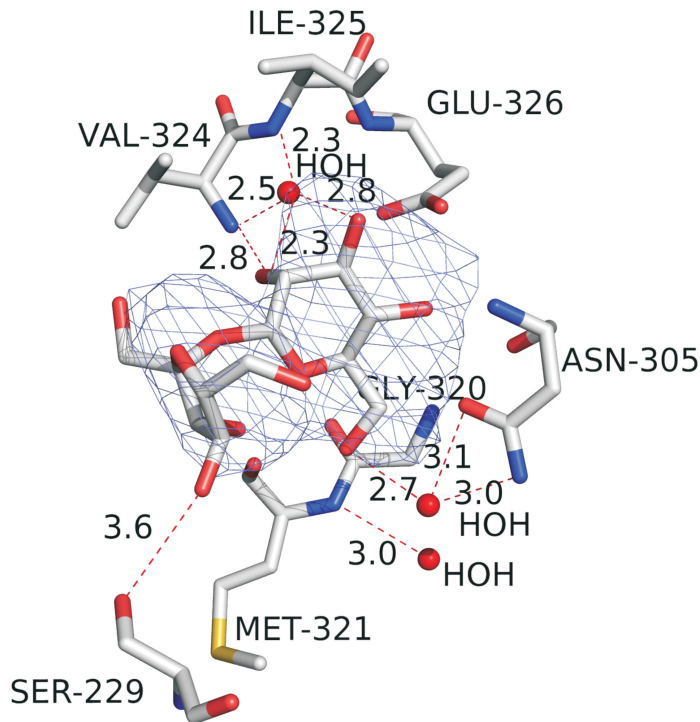


Abbildung I.11.: **Die Zuckerbindedomäne mit komplexierter Sucrose.** Sowohl die Distanzen zu Aminosäuren, die mit Sucrose wechselwirken, als auch zu potentiellen Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben. Die Elektronendichte, welche die Sucrose umgibt, ist auf dem 5 σ -Level dargestellt (aus [Krug *et al.*, 2013]).

4.2. Der Transkriptionsregulator TrmBL1

Bei TrmBL1 (TrmB-like 1) handelt es sich um ein 39,4 kDa schweres Protein, das aus 341 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Meist kommt es zu gleichen Teilen als Tetramer und Oktamer vor, aber sowohl die Zugabe von Maltose oder Maltotriose als auch eine hohe Proteinkonzentration verschieben das Gleichgewicht zum Oktamer [Lee *et al.*, 2007a]. Zudem ist TrmBL1 ein globaler, zuckersensitiver Transkriptionsregulator, der Gene des Transportsystems und von zuckermetabolisierenden Enzymen der Glycolyse und Gluconeogenese reguliert. Es besitzt genau wie TrmB eine hoch konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne mit einem Tyrosin an Position 49 als essentielle Aminosäure für die DNA-Erkennung sowie eine C-terminale Zuckerbindedomäne. Für diese C-terminale Domäne wird jedoch eine alternative Zuckerbindeaffinität und -spezifität vermutet, da nur zwei der sieben Aminosäuren (Gly₃₂₀ und Glu₃₂₆), welche in TrmB für die Zuckerbindung verantwortlich sind, konserviert vorliegen. Die benachbarten Aminosäuren jedoch sind stark konserviert und lassen auf einen ähnlichen Aufbau der Zuckerbindetasche schließen [Lee *et al.*, 2007a].

Die Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen erfolgt oft über das TGM. Je nach dessen Lage kommt es entweder zur Aktivierung oder Repression des Gens [Lee *et al.*, 2007a]. Glycolytische Enzyme, wie beispielsweise die ADP-abhängige Phosphofructokinase, werden von TrmBL1 reprimiert. Hier erfolgt die Regulation über die Bindung an das TGM, welches sich am Transkriptionsstart befindet. Dadurch wird die Rekrutierung der RNAP und somit auch die Transkription des Gens verhindert [Lee *et al.*, 2007a] (siehe Abb. I.12, a). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für MDR1 von *Archaeoglobus fulgidus* [Bell *et al.*, 1999] oder Phr von *P. furiosus* [Vierke *et al.*, 2003] beschrieben. Zudem ist TrmBL1 in der Lage Maltose, Maltotriose und Fructose sowie Glucose zu binden. Diese fungieren als Induktoren und heben eine Repression durch TrmBL1 an bestimmten Promotoren auf (siehe Abb. I.12, b) [Surma, 2011]. Bei gluconeogenetischen Enzymen, wie zum Beispiel der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, kommt es zu einer Bindung an das TGM vor der BRE/TATA-Box und somit zu einer Aktivierung der Transkription (siehe Abb. I.12, c). Dieser Mechanismus wurde bereits für Ptr2 von *Methanococcus jannaschii* [Ouhammouch *et al.*, 2003], das mit TBP interagiert, oder für TFB-RF1 (PF1088) von *P. furiosus* [Ochs *et al.*, 2012], welches mit TFB interagiert, gezeigt. Auch für TrmBL1 wird ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus per Wechselwirkung mit TBP, TFB, RNAP oder sogar einem bisher unbekannten Faktor angenommen.

5. Der Transkriptionsfaktor aMBF1 (PF0512)

Über den archaeellen Transkriptionsfaktor aMBF1 (archaeal Multiprotein Bridging Factor 1) und seine Funktion ist bisher nur sehr wenig bekannt. Aus Sequenzanalysen geht hervor, dass dieser ein Homolog zum eukaryotischen MBF1 ist, welcher zunächst im Seidenspinner *Bombyx mori* entdeckt [Li *et al.*, 1994] und später auch in Säugern, *Arabidopsis* und Hefe gefunden wurde [Takemaru *et al.*, 1997, Kabe *et al.*, 1999, Matsushita *et al.*, 2002]. In Bakterien konnte MBF1 bisher noch nicht gefunden werden, in Eukaryoten und Archaeen hingegen ist er ziemlich gut konserviert. Da MBF1 in allen Organismen, die TBP als generellen Transkriptionsfaktor verwenden, konserviert vorliegt, wird eine Co-Evolution der beiden Proteine vermutet [Liu

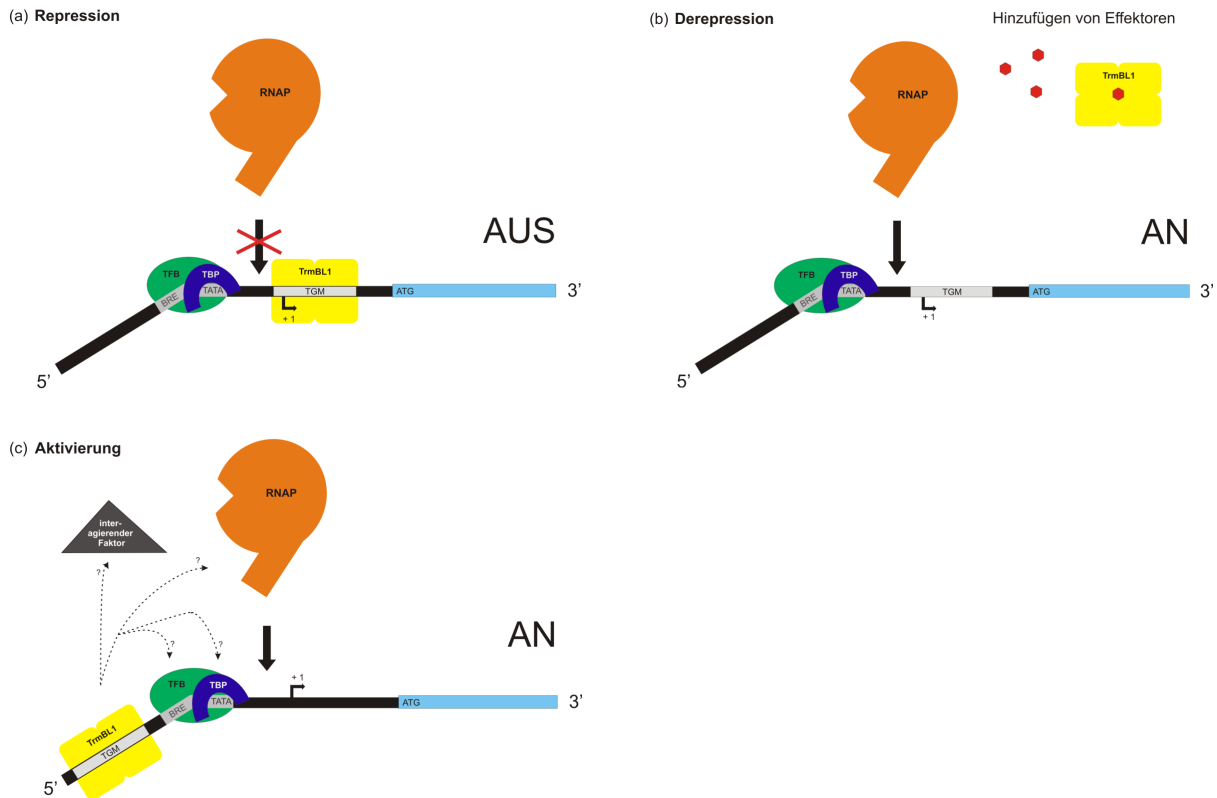


Abbildung I.12.: **Modell zur Regulationsweise von TrmBL1.** Liegt das TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box, kann die RNA-Polymerase nicht mehr binden und es kommt zu einer Repression der Transkription (a). Werden jedoch bestimmte Effektoren wie Maltose, Maltotriose, Fructose oder Glucose hinzugefügt, wird TrmBL1 vom Promotor gelöst und die Repression aufgehoben (b). Liegt das TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box kommt es zu einer Aktivierung der Transkription (c). Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass dies über Wechselwirkungen mit den basalen Transkriptionsfaktoren, der RNAP oder einem noch unbekannten Faktor geschieht. Effektoren, die eine Aktivierung verhindern, konnten bisher noch nicht gefunden werden.

et al., 2007]. aMBF1 ist in allen bisher sequenzierten Archaeen vorhanden [de Koning *et al.*, 2009, Marrero Coto, 2010] und wird sogar zu den Haupttranskriptionsfaktoren wie beispielsweise TFB und TFE gezählt [Aravind und Koonin, 1999]. In Eukaryoten ist MBF1 ein Co-Aktivatoren der Transkription. Er verbindet einen sequenzspezifischen Aktivator, meist basic-Leuzinzipper-ähnliche Proteine (z. B. Gcn4 in Hefe) oder steroidale bzw. nukleare Hormonrezeptorproteine (z. B. FTZ-F1 in Insekten), mit TBP.

MBF1 selbst ist aus zwei Teilen aufgebaut: der C-Terminus enthält eine Cro-ähnliche HTH-Domäne, welche die einzige klassische HTH-Domäne darstellt, die in allen Eukaryoten und Archaeen hoch konserviert vorliegt. Der N-terminale Bereich jedoch zeigt einen gravierenden, strukturellen Unterschied: Während er bei Eukaryoten aus einer schwach konservierten, flexiblen Domäne besteht, findet man bei Archaeen ein konserviertes Zink-Ribbon-Motiv. Das Vorhandensein dieses Motives könnte darauf hinweisen, dass archaeelles MBF1 als alleiniger Aktivator fungiert. Bisher gibt es dafür jedoch keine experimentellen Beweise [Aravind und

Koonin, 1999, de Koning *et al.*, 2009]. Zudem sind bisher keine Aktivatoren in Archaeen bekannt, die mit aMBF1 wechselwirken [Coto *et al.*, 2011].

6. Zielsetzung der Arbeit

Frühere Arbeiten mit TrmB und TrmBL1 ließen darauf schließen, dass eine Regulation der Transkription mittels verschiedener Bindehelices der beiden Proteine stattfindet [Surma, 2011]. Ein Ziel dieser Arbeit beruhte deshalb darauf, die Bindehelices der beiden Proteine auszutauschen und ihre Fähigkeit, die Transkription *in vitro* zu regulieren, genauer zu untersuchen. Des Weiteren sollten *Pyrococcus furiosus*-Mutanten hergestellt werden, in denen TrmBL1 entweder komplett deletiert ist oder Punktmutationen in den vermuteten Bindehelices besitzt. Die Auswirkung dieser Mutationen sollte anschließend *in vivo* getestet werden.

Außerdem sollte das Wachstumsverhalten der selbst konstruierten TrmBL1-Deletionsmutante gegenüber einem Simvastatin-resistenten Wildtyp-Stamm auf 1/2 SME-Medium mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin getestet werden. Dadurch sollte überprüft werden, ob TrmBL1 ein essentielles Protein des Metabolismus von *P. furiosus* darstellt und ob es einen Einfluss auf das Wachstum bzw. den Phänotyp besitzt.

Zudem konnten in ChIP-Seq-Untersuchungen von Robert Reichelt neue Gene gefunden werden, an die TrmBL1 *in vivo* bindet. Dabei stellte sich auch heraus, dass alle gebundenen DNA-Abschnitte ein TGM besitzen, welches mehr oder weniger mit der Konsensussequenz übereinstimmt. Sowohl die Bindung an sich als auch die genaue Bindestelle und die Regulation durch TrmBL1 sollten in dieser Arbeit durch *in vitro* Versuche bestätigt und der vermutete Aktivierungsmechanismus von TrmBL1 an Promotoren, bei denen das TGM vor der BRE/TATA-Box liegt, genauer untersucht werden. Eine Wechselwirkung von TrmBL1 mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Transkription wurde dabei nicht ausgeschlossen.

Ein möglicher Transkriptionsfaktor, der getestet werden sollte, war aMBF1. In Eukaryoten wechselwirkt MBF1 mit TBP und sequenzspezifischen Aktivatoren. In Archaeen ist er ebenfalls hoch konserviert und wird sogar zu den Haupttranskriptionsfaktoren gezählt. Deshalb sollte untersucht werden, ob aMBF1 sowohl als alleiniger Aktivator fungieren kann als auch, ob er mit TrmBL1 wechselwirken und dadurch zu einer verstärkten Aktivierung an bestimmten Promotoren führen kann.

II. Materialien und Methoden

1. Chemikalien

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumnickelsulfat-Hexahydrat	Fluka, Steinheim
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Serva, Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto Pepton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dextranblau	Serva, Heidelberg
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
EDTA-Na ₂ (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid (entionisiert)	Serva, Heidelberg
Gelrite	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Isotop [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP	Hartmann Analytics, Braunschweig

Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumglutamat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kaliumiodid	Merck, Darmstadt
Kobaltsulfat-Heptahydrat	Fluka, Steinheim
Kupfersulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Mangansulfat-Hydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbromid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Leuven (BE)
Natriummolybdat-Dihydrat	Janssen Chimica, Geel (BE)
Natriumselenat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumsulfid	VWR, Leuven (BE)
Natriumwolframat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Nukleosidtriphosphat Set	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Oligonukleotide	Eurofins MWG, Ebersberg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, pH 8	Roth, Karlsruhe
Phenol, puffergesättigt pH 4,5	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Resazurin	Serva, Heidelberg
Rotiphoese Gel 30 und 40	Roth, Karlsruhe
Rotiphoese Nf Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Simvastatin	Merck, Darmstadt
Stärke	Merck, Darmstadt
Strontiumchlorid	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	USB Corporation, Cleveland (USA)
Whatman-Papier	3 MM, Maidstone (GB)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zinksulfat-Heptahydrat	Fluka, Steinheim

Der Reinheitsgrad aller Chemikalien war in der Regel p. a. (pro analysi).

2. Bakterien- und Archaeenstämme

Escherichia coli DH5 α

Escherichia coli BL21(DE3)

Escherichia coli BL21(DE3)star

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS

Escherichia coli C43(DE3) [Miroux und Walker, 1996]

Pyrococcus furiosus, DSM3638 [Fiala und Stetter, 1986]

P. furiosus mit SimR vor *pf0124*

in dieser Arbeit, MURPf33

P. furiosus mit SimR und Mutation D50N in *pf0124*

in dieser Arbeit, MURPf35

P. furiosus mit SimR und Mut. D50N/E81A in *pf0124*

in dieser Arbeit, MURPf36

P. furiosus mit SimR und Δ TrmBL1

in dieser Arbeit, MURPf34

3. Plasmide und Vektoren

pUC19 (2686 bp)

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

pUC19 mit *pf0124*-SimR-Insert

in dieser Arbeit, MUR251

pUC19 mit *pf0124*-KO-SimR-Insert

in dieser Arbeit, MUR252

pUC19 mit *pf0124*-SimR Mut D50N-Insert

in dieser Arbeit, MUR253

pUC19 mit *pf0124*-SimR Mut E81A-Insert

in dieser Arbeit, MUR254

pUC19 mit *pf0124*-SimR Mut D50N/E81A-Insert

in dieser Arbeit, MUR255

pUC19 mit *pf0124*-Insert

AG Thomm, MUR069

pUC19 mit *pf0132*-Insert

in dieser Arbeit, MUR302

pUC19 mit *pf0196*-Insert

in dieser Arbeit, MUR303

pUC19 mit *pf0272*-Insert

in dieser Arbeit, MUR282

pUC19 mit *pf0287*-Insert

in dieser Arbeit, MUR283

pUC19 mit *pf0477*-Insert

in dieser Arbeit, MUR305

pUC19 mit *pf0588*-Insert

in dieser Arbeit, MUR284

pUC19 mit *pf0613*-Insert

AG Thomm, MUR070

pUC19 mit *pf0648*-Insert

in dieser Arbeit, MUR306

pUC19 mit *pf0967*-Insert

in dieser Arbeit, MUR307

pUC19 mit *pf1085.1n*-Insert

in dieser Arbeit, MUR308

pUC19 mit *pf1109*-Insert

in dieser Arbeit, MUR285

pUC19 mit *pf1350*-Insert

in dieser Arbeit, MUR309

pUC19 mit *pf1476S*-Insert

in dieser Arbeit, MUR316

pUC19 mit *pf1476L*-Insert

in dieser Arbeit, MUR317

pUC19 mit *pf1602*-Insert

in dieser Arbeit, MUR347

pUC19 mit *pf1739*-Insert

AG Thomm, pMLP

pUC19 mit *pf1784*-Insert

AG Thomm, MUR071

pUC19 mit *pf1874*-Insert

in dieser Arbeit, MUR318

pUC19 mit *pf1938*-Insert

AG Thomm, pSL195

pUC19 mit *pf2047*-Insert

in dieser Arbeit, MUR286

pCS19 (4720 bp, modifiziert)	Sung-Jae Lee, Seoul (Südkorea)
pCS19 mit TrmB-Insert, C-term. His	AG Thomm, pSL152
pCS19 mit TrmB Y50N-Insert, C-term. His	AG Thomm, MUR075
pCS19 mit TrmBL1-Insert, C-term. His	AG Thomm, pSL242
pCS19 mit TrmBL1-Insert, N-term. His	AG Thomm, pSL239
pCS19 mit TrmBL1 D50N-Insert, C-term. His	AG Thomm, MUR080
pCS19 mit TrmBL1 E81A-Insert, N-term. His	AG Thomm, MUR082
pCS19 mit TrmB + RH1 TrmBL1-Insert, C-term. His	in dieser Arbeit, MUR084
pCS19 mit TrmB + RH2 TrmBL1-Insert, C-term. His	in dieser Arbeit, MUR249
pCS19 mit TrmBL1 + RH1 TrmB-Insert, C-term. His	in dieser Arbeit, MUR085
pCS19 mit TrmBL1 + RH2 TrmB-Insert, C-term. His	in dieser Arbeit, MUR250
pET151 (5760 bp)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
pET151 mit <i>pf0512</i> -Insert, N-term. His	in dieser Arbeit, MUR337+338

4. Enzyme und Standards

DNaseI	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase A	Promega Corporation, Madison (USA)
<i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
T4 Ligase (1 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease <i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsendonuklease <i>Hind</i> III	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsendonuklease <i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsendonuklease <i>Sma</i> I	New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Die beiden Transkriptionsfaktoren TBP und TFB sowie die RNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* lagen bereits gereinigt am Lehrstuhl vor.

5. Kits

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
ReliaPrep TM gDNA Tissue Miniprep System	Promega, Madison (USA)
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

DNA Cycle Sequencing Kit
ChampionTM pET151 Directional
TOPO Expression Kit

Jena Bioscience, Jena
Life Technologies, Carlsbad (USA)

6. Allgemeine Puffer

TE-Puffer (10:1): 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8

TE'-Puffer (10:0,1): 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8

TBE-Puffer (10x): 20 mM EDTA, 900 mM Tris, 900 mM Borsäure

7. Molekularbiologische Methoden

7.1. Isolierung von Nukleinsäuren

7.1.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus *Pyrococcus furiosus*

Die Präparation der Gesamt-DNA erfolgte mit dem Promega „gDNA Tissue Kit“ mittels reversibler Bindung an eine Silika-Matrix nach Herstellerangaben. Dafür wurden 1-2 ml einer *P. furiosus* Kultur entnommen und 5 Minuten bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Mikro 120; Hettich Lab Technology, Tuttlingen) abzentrifugiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit Proteinase K und eine Behandlung des Zelllysates mit RNaseA, beides entsprechend den Herstellervorgaben, bevor das Lysat auf die Silika-Säulchen gegeben wurde. Die Konzentration der isolierten DNA sowie ihre Reinheit wurde abschließend mit einem Spektralphotometer bestimmt (siehe 7.3.3).

7.1.2. Isolierung von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung der Plasmide aus den *E. coli* DH5 α oder BL21(DE3)-Klonen wurden die Zellen einer 5-ml LB_{Amp}-Flüssigkultur für 3 Minuten bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Mikro 120; Hettich Lab Technology, Tuttlingen) abzentrifugiert und anschließend ihre Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen entsprechend dem Protokoll im Handbuch extrahiert. Die Konzentration der isolierten DNA sowie ihre Reinheit wurde abschließend mit einem Spektralphotometer bestimmt (siehe 7.3.3).

7.1.3. Ethanolfällung von DNA

Um die DNA aus ihrer Lösung zu fällen, wurde diese mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (96 %, -20°C) und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung pH 5,3 versetzt und mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 15.000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert (VWR-Hitachi CT15RE; VWR, Darmstadt) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in TE'-Puffer resuspendiert und die Konzentration der isolierten DNA sowie ihre Reinheit mit einem Spektralphotometer bestimmt (siehe 7.3.3).

7.2. Polymerasekettenreaktion [Mullis *et al.*, 1992]

Bei der Polymerasekettenreaktion oder Polymerase Chain Reaction (PCR) handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren, mit dessen Hilfe man *in vitro* bestimmte DNA-Fragmente aus einem Nukleinsäuregemisch anreichern kann. Neben einer thermostabilen DNA-Polymerase mit entsprechendem Reaktionspuffer, einer DNA-Matrize und einem dNTP-Gemisch sind noch zwei synthetische, strangspezifische Oligonukleotide aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz notwendig. Die PCR selbst erfolgt dann in mehreren Schritten. Nach einem kurzen Denaturierungsschritt, in welchem sich die im Ansatz enthaltenen dsDNA-Matrizen auftrennen, hybridisieren die Oligonukleotide an die jeweils komplementären Bereiche. Anschließend werden die 3'-Enden der Oligonukleotide mit Hilfe der DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang aufpolymerisiert. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation wird bis zu 30-mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung des entsprechenden DNA-Abschnittes kommt.

Allgemein verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Sequenz
M13_F	5'-GCC-AGG-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-A-3'
M13_R	5'-GAG-CGG-ATA-ACA-ATT-TCA-CAC-AGG-3'
T7_F	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'
T7_R	5'-TAT-GCT-AGT-TAT-TGC-TCA-G-3'
Seq_pCS19_F	5'-CTC-GAG-AAA-TCA-TAA-AAA-ATT-TAT-TTG-CTT-3'
Seq_pCS19_R	5'-GAG-TTC-TGA-GGT-CAT-TAC-TGG-ATC-3'

7.2.1. Standard-PCR

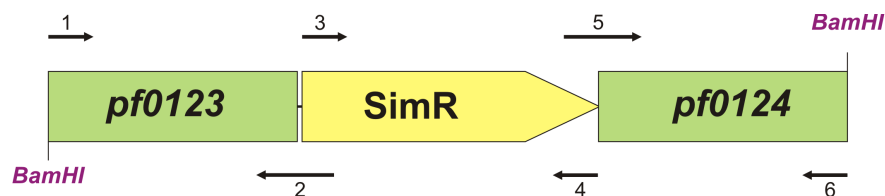
Die *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs war für die Standard-PCRs das Enzym der Wahl. Mit ihr wurden sowohl die für die Klonierungen als auch die für die Transformationen verwendeten DNA-Fragmente nach Herstellerangaben in einem Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg) hergestellt. Für die 100- μ l-Ansätze wurden jeweils ca. 50 ng DNA (bei genomischer DNA 5 ng), je 25 pmol forward- und reverse-Primer, 20 μ M dNTP-Mix sowie 3 U *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase mit zugehörigen 5x HF-Puffer verwendet. Das PCR-Programm setzte sich folgendermaßen zusammen: zunächst ein 30-sekündiger Denaturierungsschritt bei 98°C. Anschließend folgten 25-30 Zyklen bestehend aus Denaturierungs- (98°C, 15 sec), Hybridisierungs- (45-60°C, 30 sec) und Elongationsschritt (72°C, 15-30 sec/1 kb) sowie einem finalen Extensionsschritt (72°C, 5 min). Eine Analyse der in der PCR gebildeten DNA-Produkte erfolgte via Agarosegelelektrophorese (siehe 7.3.1). Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen und eine Konzentrationsbestimmung mit dem Spektralphotometer (siehe 7.3.3).

7.2.2. Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR wurde überprüft, ob die transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen den Vektor aufgenommen haben. Dazu wurden Einzelkolonien von den LB_{Amp}-Platten mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und das Zellmaterial in je 20 μ l PCR-Ansatz resuspendiert. Für diese Art von PCR wurde die *Taq* DNA-Polymerase von Fermentas verwendet und diese entsprechend den Herstellerangaben nach Standardprotokoll für rekombinante Klone durchgeführt. Um einen möglichst großen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten, wurde der initiale Denaturierungsschritt auf 3 Minuten bei 95°C verlängert. Durch die Kolonie-PCR wird der Bereich auf dem Vektor amplifiziert, der zwischen T7-Promotor und T7-Terminator liegt. Ist in diesem Bereich ein Insert vorhanden, kommt es während der Agarosegelelektrophorese (siehe 7.3.1) zu einem Shift der DNA-Bande im Vergleich zur Kontroll-PCR mit Vektor ohne Insert.

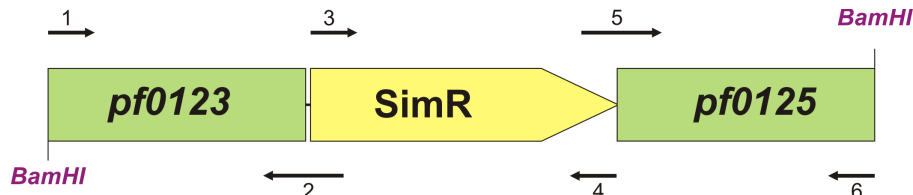
7.2.3. Fusions-PCR [Higuchi, 1990]

Diese Art der PCR wurde verwendet, um die Genfragmente für die Klonierung in *P. furiosus* zu konstruieren. Auch für diese PCRs wurde die *Phusion* High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs verwendet. Die Oligonukleotide für diese Ansätze wurden jedoch speziell designet, da sie sowohl Bereiche besitzen, die komplementär zu dem zu amplifizierenden Gen sind, als auch Bereiche, die komplementär zu anderen Gensequenzen sind. Zunächst mussten die drei zu fusionierenden Fragmente via Standard-PCR erstellt werden. Die beiden Fragmente, welche die Sequenzen aus *P. furiosus* beinhalten, wurden mit den Primerpaaren Nr. 1+2 und 5+6 aus genomischer DNA von *P. furiosus* hergestellt. Die Simvastatin-Resistenzkassette wurde mit dem Primerpaar 3+4 aus dem Plasmid von MUR62 erstellt. Alle Fragmente wurden via präparativer Gelelektrophorese gereinigt (siehe 7.3.2), anschließend in neue PCR-Reaktionen in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt und miteinander fusioniert. Das Gesamtkonstrukt wurde abschließend mit dem Primerpaar 1+6 erstellt. Für alle Fusions-PCRs wurde das Protokoll für Standard-PCRs verwendet (siehe 7.2.1) mit dem Unterschied, dass die Oligonukleotide (0,1 μ M) erst nach drei Zyklen bei etwas niedrigerer Annealingtemperatur zugegeben wurden. Anschließend erfolgte die Amplifikation des gesamten Fusionsproduktes in 27 Zyklen unter Normalbedingungen. Die Syntheszeit des Elongationsschrittes musste dabei entsprechend auf die Gesamtlänge des Fusionsproduktes eingestellt werden. Eine Analyse der in der PCR gebildeten DNA-Produkte erfolgte via Agarosegelelektrophorese (siehe 7.3.1). Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen und eine Konzentrationsbestimmung mit dem Spektralphotometer (siehe 7.3.3). Vor der endgültigen Transformation in *P. furiosus* (siehe 7.5.2) wurden die Gesamtfragmente zunächst über die BamHI-Schnittstelle in pUC19 ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 α zwischenkloniert (MUR251 und MUR252) (siehe 7.4.2, 7.4.3 und 7.4.4).



Nr.	Primername	Sequenz
1	pf0124_-1200_BamHI_F	5'-TTA-CCC-GGA-TCC-TAT-GTT-CT-3'
2	pf0124_Sim_?L_R	5'-AAA-GTT-CAT-AAA-AAT-GAT-GAA-ATG-CCC-ATG-TAT-AAA-AGT-TTT-GGC-ATA-GAG-T-3'
3	SimR_Prom_F	5'-GGG-CAT-TTC-ATC-ATT-TTT-ATG-AA-3'
4	SimR_Term_R	5'-CGA-AGG-CTT-AAA-CTT-CTG-TTT-CG-3'
5	pf0124_Sim_?L_F	5'-GAA-ACA-GAA-GTT-TAA-GCC-TTC-GTT-GGA-CTC-TAT-GCC-AAA-ACT-T-3'
6	pf0124_+1116_BamHI_R2	5'-TCC-CCG-GGA-TCC-GAG-TAG-GAG-TTC-3'

Abbildung II.1.: **Konstruktion des Fusions-PCR-Fragmentes für den *P. furiosus* Wildtyp mit Simvastatinresistenz.** Die einzelnen PCR-Fragmente wurden zunächst mit den Primern 1+2 und 5+6 aus genomischer DNA von *P. furiosus* sowie mit den Primern 3+4 mit Plasmid-DNA aus MUR62 erstellt. Anschließend wurden die einzelnen Fragmente via Fusions-PCRs miteinander verbunden und zum Schluss das Gesamtfragment mit den Primern 1+6 amplifiziert.



Nr.	Primername	Sequenz
1	BHI-PF0124up-F	5'-AAA-TTA-GGA-TCC-TTC-CAT-AAC-TTG-CCA-ATT-CC-3'
2	SimR-fus-1up-R	5'-GAA-ATG-CCC-TAA-TAT-AGA-CCC-CCC-TAT-GAG-TTT-TAC-3'
3	TkSimR-fus-F	5'-GGG-GTC-TAT-ATT-AGG-GCA-TTT-CAT-CAT-TTT-TAT-G-3'
4	dwn-fus-SimR-R	5'-CAA-GAA-GGA-TAA-CGA-AGG-CTT-AAA-CTT-CTG-TTT-CG-3'
5	SimR-fus-dwn-F	5'-GTT-TAA-GCC-TTC-GTT-ATC-CTT-CTT-GAC-TGA-TTC-TTT-TC-3'
6	BamHI-PF0124downstr.-R	5'-CCT-ATA-GGA-TCC-AGG-CAG-GTT-TAC-ACC-A-3'

Abbildung II.2.: **Konstruktion des Fusions-PCR-Fragmentes für die *P. furiosus* pf0124-Deletionsmutante mit Simvastatinresistenz.** Die einzelnen PCR-Fragmente wurden zunächst mit den Primern 1+2 und 5+6 aus genomischer DNA von *P. furiosus* sowie mit den Primern 3+4 mit Plasmid-DNA aus MUR62 erstellt. Anschließend wurden die einzelnen Fragmente via Fusions-PCRs miteinander verbunden und zum Schluss das Gesamtfragment mit den Primern 1+6 amplifiziert.

7.2.4. Mutations-PCR

Um die *P. furiosus*-Mutanten pf0124-SimR-Mut D50N, pf0124-SimR-Mut E81A sowie die Doppelmutante pf0124-SimR-Mut D50N/E81A erstellen zu können, wurden Mutations-PCRs durchgeführt. Als Matrize für die Punktmutanten wurde der pUC19-Vektor mit der Simvastatin-Resistenzkassette vor dem TrmBL1-Gen verwendet (MUR251). Als Matrize für die Doppelmutante diente die hergestellte pf0124-SimR-Mut D50N-Punktmutante (MUR253). Die Herstellung der Mutanten erfolgte mit dem *Phusion* Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben. Nach der Transformation in *E. coli* DH5 α wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und die Plasmide der positiven Klone sequenziert (siehe 7.2.2, 7.1.2 und 7.4.6). Richtige Klone wurden als Reinkulturen in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie hinterlegt (MUR253-255).

Primer für die Mutations-PCRs:

Bezeichnung	Sequenz
pf0124-SimR_...	
Mut-g-3374-a_F	5'- P -CACACGAGAATCTACAATGTTCTAAGCTCTC-3'
Mut-g-3374-a_R	5'- P -AGGTATTCCACTTTCTTTTCGTAACATCTGTAGC-3'
Mut-a-3468-c_F	5'- P -ATCCAGAAATAGTTCTTGCAAAAATCAGGGAAGATTT-3'
Mut-a-3468-c_R	5'- P -TTACTGGAGCATAAAGTCTTGGAGTTCCATG-3'

7.3. Weitere Standardmethoden

7.3.1. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Eine Analyse der in der PCR gebildeten DNA-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol hin aufgetrennt [Sambrook *et al.*, 1989]. Für diese Arbeit wurden 1,5%ige Agarosegele mit Ethidiumbromid verwendet. Es wurden je 5 μ l Probe sowie ein Größenstandard (GeneRuler 100 bp oder 1 kB Ladder) mit 1 μ l 6x Auftragspuffer (Loading Dye; Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA) versehen und direkt auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 mA/100 V und Raumtemperatur mit 1x TBE als Laufpuffer, bis sich alle Markerbanden gut sichtbar aufgetrennt hatten (ca. 30-45 Minuten). Anschließend konnte das Gel in einem UV-Transilluminator (Biodocit, 366 nm; UVP, San Gabriel/USA) aufgrund des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids analysiert werden.

7.3.2. Präparative Agarosegelelektrophorese

Um reine DNA-Produkte der richtigen Länge zu erhalten, wurde nach der PCR der gesamte Ansatz mit einem Größenstandard (GeneRuler 100 bp oder 1 kB Ladder) auf ein 1,5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Nach dem Lauf wurde die entsprechende Bande mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben gereinigt. Die Elution erfolgte in 20 μ l Elutionspuffer.

1,5%iges Agarosegel: 0,45 g Agarose, 3 ml 10x TBE, 3 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml), H₂O_{bidest} ad 30 ml

7.3.3. Überprüfung des Reinheitsgrades und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung sowie eine Überprüfung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektralphotometers (PeqLab, Erlangen). Dabei entspricht eine Extinktion von 1 bei 260 nm im Falle einer doppelsträngigen DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ und im Falle von RNA 40 $\mu\text{g/ml}$ [Sambrook *et al.*, 1989]. Liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm zwischen 1,5 und 2, handelt es sich um eine reine Lösung [Wilfinger *et al.*, 1997].

7.4. Klonierungen in *Escherichia coli*

7.4.1. Erzeugung der DNA-Matrizen für Klonierungen in *Escherichia coli*

Die gewünschten DNA-Bereiche wurden über Standard-PCRs aus genomischer DNA von *P. furiosus* erzeugt (siehe 7.2.1). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind unten gelistet. Nach der Überprüfung auf einem Agarosegel wurde ihre Reinheit sowie die Konzentration bestimmt (siehe 7.3.1 und 7.3.3).

Primer für Klonierungen in den pUC19-Vektor:

Bezeichnung	Sequenz
pf0132_-200_F	5'-GGA-TCC-GAC-CCG-GTT-GAT-AGG-GCG-GGG-3'
pf0132_+200_R	5'-AAG-CTT-TAG-GTA-TCT-CCC-CCA-GAA-GTG-3'
pf0196_-200_F	5'-CAG-GGT-TAT-TAC-TGA-TTC-CCA-G-3'
pf0196_+100_R	5'-AGT-ACC-CCT-CCA-TGT-CGC-TTA-G-3'
pf0272_SmaI_F	5'-CCC-GGG-TCA-CTT-GAT-TCT-TTT-TCA-TTA-ATG-3'
pf0272_BamHI_R	5'-GGA-TCC-TGG-AGC-CAC-TCA-ATG-AGG-GGG-CC-3'
pf0287_SmaI_F	5'-CCC-GGG-CTT-TTA-TTG-GTA-GGC-TTA-TAA-ATG-3'
pf0287_BamHI_R	5'-GGA-TCC-ACC-ATG-TTG-GGT-TGT-CCT-TTC-AT-3'
pf0312_-100_F	5'-GAA-GAA-AGG-GTA-GGT-AGC-TGA-GCG-3'
pf0312_+200_R	5'-ATT-TTA-TCT-GGG-AGC-TCT-TCT-GAA-3'
pf0477_-110_F	5'-GGT-TCT-CCC-CAG-GAA-TTG-TTT-TTA-T-3'
pf0477_+140_R	5'-CCC-TCT-TCA-AGC-TCC-AAG-TAT-TTT-G-3'
pf0588_SmaI_F	5'-CCC-GGG-TCA-TTC-TAA-GGC-CAG-GAG-AAA-GCA-3'
pf0588_BamHI_R	5'-GGA-TCC-CTT-AGA-AGT-CCG-CTT-ATT-AGA-GC-3'
pf0648_-300_F	5'-GGA-TCC-CTT-GAG-CAT-TGG-TTT-TAG-CAA-3'
pf0648_+200_R	5'-AAG-CTT-ATG-GCC-TTT-TTG-TTG-CTC-TTG-3'
pf0967_-200_F	5'-CAA-ATC-CCA-AAA-AAG-AAC-CAA-AGC-CAA-3'
pf0967_+200_R	5'-GGA-TCC-GCA-GGC-TCT-GGA-CAG-TAG-ATG-3'
pf1057_-200_F	5'-TTA-TTT-TCT-TTA-GGT-TCC-ATA-C-3'
pf1057_+100_R	5'-TCG-CGT-CAC-TTA-TTA-TTT-TTC-C-3'
pf1085_-200_F	5'-GGA-TCC-CAA-GGC-TGC-TAA-AGA-TAT-AGA-3'
pf1085_+200_R	5'-AAG-CTT-CTG-GTT-ATC-ATT-ACC-TTT-GCT-3'
pf1109_SmaI_F	5'-CCC-GGG-TCT-TAA-AAG-AGA-AGG-GTT-ATA-GGG-3'

pf1109_BamHI_R	5'-GGA-TCC-TCC-CAG-GCA-ATG-TAC-AAT-TTG-TC-3'
pf1188_-110_F	5'-CAA-GCC-CAA-TCA-CAT-CAA-AAC-TCT-T-3'
pf1188_+140_R	5'-AAA-CTT-CCA-TGG-GAG-AAG-TTT-ATT-C-3'
pf1350_-200_F	5'-GGA-TCC-CCC-CCA-CAA-GTA-TCT-GAC-AGG-3'
pf1350_+200_R	5'-AAG-CTT-GTT-CCC-GAG-AGG-TAG-CTC-AAA-3'
pf1476_-100_F	5'-GCT-GAA-AAA-GAA-GAT-GTG-AAC-TTA-3'
pf1476_+53_F	5'-TTC-AAG-CAT-TTT-TAT-TCA-CTT-CAA-3'
pf1476_+353_R	5'-GAG-GAT-ACA-TAA-CCT-CCT-TCT-TCC-3'
pf1874_-120_F	5'-ATT-AGA-ATC-GAA-TTT-GAA-3'
pf1874_+66_R	5'-AGT-TAC-GGC-GTA-GGC-TAC-CCT-CTT-3'
pf2047_SmaI_F	5'-CCC-GGG-TTG-AAA-AAG-AAG-GAC-ACT-TAA-TAA-3'
pf2047_BamHI_R	5'-GGA-TCC-AGA-GTT-TCA-GCA-AGA-TCT-ACC-CA-3'

Die Promotorbereiche der Gene *pf0124*, *pf0613*, *pf1602*, *pf1739*, *pf1784* und *pf1938* lagen bereits kloniert in pUC19 vor.

7.4.2. Restriktionshydrolyse

Sowohl die zu klonierenden PCR-Fragmente als auch der Vektor mussten zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert werden. Die entsprechenden Restriktionsendonukleasen sind im Anhang in den einzelnen Abbildungen zu den Genbereichen zu finden (siehe Anhang, 1.).

Der 20- μ l-Ansatz zur Restriktionshydrolyse des Vektors bestand aus 0,5 pmol Vektor, je 20 U Restriktionsenzym mit dem entsprechenden Reaktionspuffer in einfacher Konzentration sowie, bei Bedarf, BSA. Der Verdau erfolgte für 60 Minuten bei 25-37°C (je nach optimaler Inkubationstemperatur des Restriktionsenzyms). Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Alkalischer Phosphatase, um die geschnittenen Enden des Vektors zu dephosphorylieren und somit einen erneuten Ringschluss zu verhindern. Hierzu wurde der gesamte Restriktionsansatz mit 2 μ l NE-Buffer 4 und 20 U Alkalischer Phosphatase sowie $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ ad 40 μ l versetzt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll sowie eine Kontrolle auf einem Agarosegel (siehe 7.3.1). Wurden die PCR-Fragmente nicht über die *SmaI*-Schnittstelle in den Vektor eingefügt, mussten diese ebenfalls einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen unterzogen werden. Der Verdau erfolgte dann unter den gleichen Bedingungen wie für den Vektor (siehe oben). Im Gegensatz zum Vektor wurden die PCR-Fragmente anschließend einer Polynukleotid Kinase (PNK)-Behandlung unterzogen. Dazu wurden 50 ng des DNA-Fragmentes mit 10 U T4 PNK und Ligasepuffer in einfacher Konzentration sowie $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ ad 10 μ l versetzt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die T4 PNK werden γ -Phosphate von ATP auf 5'-OH Gruppen übertragen und somit die PCR-Fragmente phosphoryliert. Vor der Ligation erfolgte noch eine Hitzeinaktivierung der T4 PNK bei 65°C für 20 Minuten, um eine Phosphorylierung des Vektors während der Ligation zu unterbinden.

7.4.3. Ligation

Für die Ligation wurde der Vektor (50 ng) in einem Verhältnis von 1:3 zum PCR-Fragment eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontroll-Ligation durchgeführt, bei der das PCR-Fragment durch steriles Wasser ersetzt wurde. Zudem wurden 400 U T4 DNA-Ligase und einfach konzentrierter Ligasepuffer verwendet. Das Volumen des Ligationsansatzes betrug je 10 μl . Die Ligation erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend konnten die Ligationsansätze in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert werden.

7.4.4. Hitzeschock-Transformation in *Escherichia coli* [Hanahan, 1983]

Die verwendeten kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen wurden chemisch mittels MgCl₂-Methode nach Inoue [Inoue *et al.*, 1990] hergestellt. Die Transformationen erfolgten nach folgendem Schema (stets auf Eis arbeiten): 2 μl Ligationsansatz wurden zu 20 μl chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Anschließend wurden die Ansätze nochmals 2 Minuten auf Eis gelagert, bevor 1 ml SOC-Medium zugegeben und das Ganze eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Danach wurden 100 μl der Transformationsansätze auf vorgewärmte LB_{Amp}-Agarplatten mit IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Rest der Transformationsansätze wurde 5 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 100 μl frischem SOC-Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurde auch das resuspendierte Pellet auf vorgewärmte LB_{Amp}-Agarplatten mit IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden noch zwei Kontroll-Transformationen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde 1 ng des ungeschnittenen pUC19-Vektors in die Transformation eingesetzt, als Negativkontrolle diente steriles Wasser.

SOC-Medium pH 7,0: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,2 g KCl, H₂O_{bidest} ad 970 ml (autoklavieren und vor Gebrauch 10 ml steriles MgCl₂ (1 M) und 20 ml sterile Glucose (1 M) zufügen)

7.4.5. Antibiotika-Selektion und α -Komplementation

Die Selektion von Transformanden spielt bei der Klonierung eine wichtige Rolle. Meistens verwendet man dazu ein Resistenzgen für ein Antibiotikum, welches über einen Vektor in die Zellen eingeschleust wird. Der hier verwendete Vektor pUC19 besitzt ein solches Resistenzgen, nämlich die β -Lactamase. Dieses Enzym ist in der Lage, das auf den Platten enthaltene Ampicillin zu inaktivieren. Somit sind Bakterienzellen, die den Vektor aufgenommen haben, gegen Ampicillin resistent und können wachsen. Zellen, die hingegen kein Plasmid aufgenommen haben, können nicht wachsen.

Um nach der Transformation sofort optisch entscheiden zu können, welche Kolonien nicht nur den Vektor sondern auch ein Insert im Polylinker-Bereich besitzen, wurde zusätzlich noch eine α -Komplementation bzw. Blau-Weiß-Selektion nach Ullmann, Jacob und Monod [Ullmann *et al.*, 1967] durchgeführt. Die LB_{Amp}-Agarplatten enthielten dafür zusätzlich 0,2 mM IPTG und 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal (Endkonzentrationen). Nach dem Bebrüten waren Kolonien, die nur das Plasmid ohne zusätzliches Insert aufgenommen haben, blau gefärbt. Wurde durch die Ligation im

Polylinkerbereich ein zusätzliches DNA-Fragment eingebaut, waren weiße Kolonien auf der Platte zu erkennen. Einige der positiven Klone wurden anschließend auf eine neue LB_{Amp}-Agarplatte überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese standen dann am nächsten Tag für eine Kolonie-PCR zur Verfügung (siehe 7.2.2).

7.4.6. Sequenzierung

Zur genauen Verifizierung der eingebauten DNA-Fragmente wurden die Vektoren der entsprechend positiv getesteten Kolonien nach Plasmidisolierung (siehe 7.1.2) sequenziert. Dies erfolgte bei der Firma Seqlab in Göttingen. Aus richtigen Einzelkolonien wurden Reinkulturen erstellt und in der Bakterienbank des Lehrstuhl für Mikrobiologie hinterlegt.

7.4.7. Klonierung des Proteins PF0512

Das Protein PF0512 wurde zur Aufreinigung mit einem N-terminalen His-Tag versehen. Dazu wurde der Champion pET151 Directional TOPO Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad/USA) verwendet. Um genügend pET151-Vektor mit *pf0512*-Insert für die Klonierung in *E. coli* BL21(DE3)star zu besitzen, wurde dieser zunächst nach dem Protokoll des Herstellers in *E. coli* DH5 α zwischenkloniert. Die positiven Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR überprüft, anschließend sequenziert (siehe 7.2.2 und 7.4.6) und als Reinkultur in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie hinterlegt (MUR337). Nach Plasmidisolierung aus MUR337 (siehe 7.1.2) erfolgte die Klonierung in *E. coli* BL21(DE3)star nach dem Protokoll des Herstellers. Die dazugehörige Reinkultur wurde in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie hinterlegt (MUR338).

Primer für die Klonierung in den pET151-Vektor:

Bezeichnung	Sequenz
pf0512_F +CACC	5'-CAC-CAT-GGC-AAA-GGC-TAA-GCC-CAG-GTA-T-3'
pf0512_R	5'-TTA-CTT-CTT-CCT-CTT-CTT-TAC-CTT-TAT-3'

7.5. Klonierungen in *Pyrococcus furiosus*

Zunächst wurde ein *P. furiosus*-Stamm erstellt, der in seinem Genom zusätzlich eine Simvastatin-Resistenzkassette enthielt. Diese besteht aus der Promotor- und Terminatorsequenz des *gdh*-Gens aus *P. furiosus* sowie dem HMG-CoA-Reduktase-Gen aus *T. kodakarensis* (*tk0914*). Die SimR-Kassette wurde von Ingrid Waage konstruiert und ist bereits in der Klonbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie als Reinkultur MUR62 hinterlegt. Um die Kassette via homologer Rekombination an der gewünschten Stelle im Genom von *P. furiosus* platzieren zu können, wurde die SimR-Kassette mit 1200 bp langen Fragmenten des stromauf- und -abwärts flankierenden, chromosomalen Bereiches vor der BRE/TATA-Box des *pf0124*-Gens fusioniert (siehe Abb. II.1).

In dieser Arbeit wurde zudem eine TrmBL1-Deletionsmutante erstellt, in der das Gen für TrmBL1 (*pf0124*) durch die Simvastatin-Resistenzkassette substituiert wurde. Dazu wurde die SimR-Kassette mit 1000 bp langen Fragmenten des stromauf- und -abwärts flankierenden,

chromosomalen Bereiches von *pf0124* fusioniert, so dass die SimR-Kassette das *pf0124*-Gen ersetzt (siehe Abb. II.2).

Die jeweiligen Gesamtfragmente wurden zunächst mittels Fusions-PCR amplifiziert (siehe 7.2.3), später via BamHI-Schnittstellen in pUC19 ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe 7.4.2, 7.4.3 und 7.4.4). Erhaltene Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (siehe 7.2.2) selektiert und anschließend die Plasmide isoliert und sequenziert (siehe 7.1.2 und 7.4.6). Die Reinkulturen und Plasmide sind in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie als MUR251 (pf0124-SimR) und MUR252 (pf0124-SimR-KO) hinterlegt.

Zudem wurde noch eine TrmBL1 D50N, E81A und D50N/E81A-Mutante mittels PCR mit Mutationsprimern in pUC19 erstellt und anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe 7.2.4 und 7.4.4). Die Stämme und Plasmide sind in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie als MUR253 (pf0124-SimR-Mut D50N), MUR254 (pf0124-SimR-Mut E81A) und MUR255 (pf0124-SimR-Mut D50N/E81A) hinterlegt.

7.5.1. Erzeugung der DNA-Matrizen für Klonierungen in *Pyrococcus furiosus*

Die DNA-Matrizen für die Klonierungen in *P. furiosus* wurden via Standard-PCR mit den jeweiligen pUC19-Vektoren (pMUR251-255) amplifiziert, per Agarosegelelektrophorese kontrolliert und ihre Reinheit bestimmt (siehe 7.2.1, 7.3.1 und 7.3.3). Anschließend wurde die nackte DNA direkt in *P. furiosus* transformiert.

7.5.2. Hitzeschock-Transformation bei *Pyrococcus furiosus*

Dazu wurde der *P. furiosus* Wildtyp-Stamm über Nacht bei 75°C bis zu einer Zelldichte von ca. $1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml (exponentielle Wachstumsphase) inkubiert. Am nächsten Tag wurden zunächst 3 ml der Kultur anaerob entnommen, auf zwei 1,5-ml-Eppendorf-Cups verteilt und abzentrifugiert (10 min bei 9.500 rpm). Die Zellpellets aus den beiden Cups wurden in insgesamt 100 μ l Transformationspuffer resuspendiert und in ein 0,5-ml-Cup überführt. Im Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg) wurden die Zellen anschließend für 90 Minuten anaerob bei 4°C weiter inkubiert, wobei nach 30 Minuten die zu transformierende DNA zugegeben wurde ($c = 500$ ng in max. 10 μ l). Danach erfolgte zunächst ein Hitzeschock bei 80°C für 3 Minuten und anschließend ein weiterer Inkubationsschritt bei 4°C für 10 Minuten. Mit dem Transformationsansatz wurde daraufhin 1/2 SME-Flüssigmedium (mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin) beimpft und bei 85°C inkubiert. Nach erneuter Überimpfung des Transformationsansatzes wurde dieser auf 1/2 SME-Gelriteplatten (mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin) ausplattiert und bei 85°C in einem gasdichten Behälter bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden anschließend von den Platten gepickt und über Nacht in 1,5 ml 1/2 SME-Flüssigmedium (mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin) gezogen. Am nächsten Tag erfolgte eine DNA-Isolierung (siehe 7.1.1), um via PCR das transformierte Konstrukt nachweisen und anschließend sequenzieren lassen zu können (siehe 7.2.1 und 7.4.6). Aus richtigen Einzelkolonien wurden Reinkulturen in 1/2 SME-Flüssigmedium (mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton

sowie 10 μM Simvastatin) hergestellt und in der Bakterienbank des Lehrstuhls für Mikrobiologie hinterlegt (MURPf33-36). Die *P. furiosus*-Mutante E81A konnte bisher nicht erstellt werden.

Transformationspuffer: 40 mM Na-Pyruvat, 4,67 mM NH_4Cl , 80 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1/2 SME pH 7,0

Simvastatin: MW = 418,57 g, Endkonzentration: 1 mM; 42 mg Simvastatin in 100 ml EtOH lösen, durch 0,2 μm Filter steril filtrieren und in N_2 -begaster Serumflasche bei -20°C aufbewahren

7.6. Electrophoretic Mobility Shift Assays

Um die spezifische Bindung von Proteinen an eine markierte Template-DNA analysieren zu können, werden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei wandert die freie, markierte DNA im Gel langsam vom Minus- zum Pluspol. Findet eine spezifische Bindung eines Proteins an die DNA statt, verringert sich die Laufgeschwindigkeit der markierten DNA, und es kommt zu einem Shift. Diese Methode wird auch als Electrophoretic Mobility Shift Assay oder EMSA bezeichnet.

7.6.1. Erstellung der DNA-Matrizen für EMSAs

Die Template-DNAs für die EMSA-Versuche wurden mittels PCR erzeugt. Hierzu wurden die benötigten Promotorbereiche mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden nach Standardprotokoll amplifiziert (siehe 7.2.1). In den meisten Fällen wurde der M13_F-FAM- mit dem M13_R-Primer verwendet. Als Matrize dienten die zuvor erzeugten pUC19-Vektoren mit den jeweiligen Genbereichen (siehe 3). Die PCR-Produkte wurden nach Amplifikation auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert (siehe 7.3.1), mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt und ihre Konzentration mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt (siehe 7.3.3).

Primer zur Erstellung der DNA-Matrizen für EMSAs:

Bezeichnung	Sequenz
M13_F-FAM	5'-GCC-AGG-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-A-3'
M13_R	5'-GAG-CGG-ATA-ACA-ATT-TCA-CAC-AGG-3'
5PF1784	5'-TTC-AGC-ATT-CAG-GTT-TAC-GAT-AGC-A-3'
pf1874_+66_R	5'-AGT-TAC-GGC-GTA-GGC-TAC-CCT-CTT-3'
EMSA_MD_F	5'-ATA-AAG-TAC-TAA-AAT-TTC-TCT-TTG-ACG-3'
EMSA_MD_R-FAM	5'-AAG-AGC-AAA-GGC-GTA-TGT-TGC-TCT-3'

7.6.2. Bindung von Proteinen an fluoreszenzmarkierte DNA

Es wurden 15- μ l-Ansätze vorbereitet, die den EMSA-Salzmix, 20 ng der jeweiligen DNA-Matrize und 1,5 μ l Glycerin enthielten. Den Ansätzen wurden außerdem unterschiedliche Konzentrationen an TrmBL1 oder aMBF1 hinzugefügt und – wenn nötig – ein Salzausgleich mit Proteinpuffer durchgeführt. Für die Bindereaktion wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 70°C in einem Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg) inkubiert, anschließend auf 40°C abgekühlt und sofort auf ein nicht-denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

EMSA-Salzmix: 150 mM NaCl, 25 mM Na-Hepes pH 7,5

7.6.3. Polyacrylamidgelelektrophorese

Um eine spezifische Bindung von TrmBL1 bzw. aMBF1 an die jeweiligen DNA-Matrizen nachweisen zu können, wurden EMSA-Versuche mit nicht-denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde das Gel einem 30-minütigen Vorlauf unterzogen, um es anzuwärmen. Anschließend wurden 15 μ l der Proben auf das Gel aufgetragen und bei 200 V/25 mA sowie 40°C Geltemperatur einer 45-minütigen Elektrophorese (MiniProtean; Bio-Rad, Hercules/USA) unterzogen. Die Auswertung erfolgte direkt nach dem Lauf mit dem Imaging-Analyzer (FLA-5000; Fujifilm, Tokio/Japan).

Stammlösung für 6%ige Polyacrylamidgele: 100 ml 10x TBE, 200 ml Rotiphorese Gel 30, 20 ml Glycerin, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

6%ige Polyacrylamidgele: 15 ml Stammlösung, 150 μ l APS (10 %), 15 μ l TEMED

EMSA-Laufpuffer: 1x TBE, 4 % Glycerin

7.7. *In vitro* Transkriptionen

7.7.1. Erstellung der DNA-Matrizen für die *in vitro* Transkriptionen

Die Template-DNAs für die *in vitro* Transkriptionen wurden ebenfalls mittels PCR erzeugt. Hierzu wurden die benötigten Promotorbereiche mit M13_F- und M13_R-Primern nach Standardprotokoll amplifiziert (siehe 7.2.1). Als Matrize dienten 25 ng Plasmid-DNA der zuvor erzeugten pUC19-Vektoren mit den jeweiligen Genbereichen (siehe 3). Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte nach Amplifikation auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert (siehe 7.3.1), mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt und ihre Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt (siehe 7.3.3). Die Matrizen wurden anschließend bei -20°C eingefroren.

7.7.2. Run-off *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkriptionen erfolgten nach dem speziell für *P. furiosus* entwickelten, zellfreien Transkriptionssystem nach Hethke [Hethke *et al.*, 1996]. Es wurde jedoch für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente optimiert. Für die Transkription wurden 25- μ l-Ansätze vorbereitet, die jeweils Transkriptionspuffer sowie 190 nM TBP, 60 nM TFB und 11 nM RNAP enthielten. Da mehrere DNA-Matrizen unterschiedlicher Länge verwendet wurden, mussten

diese in äquimolaren Mengen von 6 nM eingesetzt werden. Außerdem wurden dem Ansatz 1 μ l NTP-Mix und 2 μ Ci [α^{32} P]-UTP zugefügt. Die Proteine TrmBL1 bzw. aMBF1 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und die Ansätze mit Proteinpuffer ausgeglichen, um eine gleichmäßige Salzkonzentration zu erhalten. Die Transkription an sich erfolgte dann für 15-30 Minuten bei 85°C in einem Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg).

Transkriptions-Salzmix: 3 mM MgCl₂, 250 mM KCl, 1 mM DTT, 40 mM Na-Hepes pH 7,3

Nukleosidtriphosphat-Mix: 2,75 mM ATP, 2,75 mM CTP, 2,75 mM GTP, 0,067 mM UTP

TBP-Verdünnungspuffer: 10 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM Tris pH 8,0

TFB-Verdünnungspuffer: 10 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM Tris pH 8,0

RNAP-Verdünnungspuffer: 10 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 350 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM Tris pH 8,0

Proteinpuffer pH 7,5: 15 % Glycerin (v/v), 300 mM NaCl, 25 mM Na-Hepes

7.7.3. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Um die durch spezifische Transkription erhaltenen RNA-Produkte analysieren zu können, wurde eine Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden 6%ige Gele verwendet. Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde das Gel einem 30-minütigen Vorlauf unterzogen, um es anzuwärmen. Währenddessen wurden die Proben mit 3x Auftragspuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 15 μ l der Proben auf das Gel aufgetragen und bei 400 V/25 mA sowie 40°C Geltemperatur einer Elektrophorese unterzogen (MiniProtean; Bio-Rad, Hercules/USA). Nach einer Laufzeit von 60–75 Minuten wurde das Gel auf Whatmanpapier übertragen und für 40 Minuten bei 80°C in einer Vakuum-Geltrocknungsanlage (Bio-Rad, Hercules/USA) getrocknet. Anschließend wurde für ca. zwei Stunden eine Imaging Plate (BAS-IP MS 2040, 20x40 cm; Fujifilm, Tokio/Japan) aufgelegt und später mit Hilfe eines Imaging Analyzers (FLA-5000; Fujifilm, Tokio/Japan) ausgewertet.

Stammlösung für 6%ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele: 420 g Harnstoff, 100 ml 10x TBE, 500 ml Rotiphorese Gel 40, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

6%ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele: 20 ml Stammlösung, 200 μ l APS (10 %), 20 μ l TEMED

3x Auftragspuffer für Polyacrylamid-Harnstoff-Gele: 10 mM EDTA, 98 % Formamid (v/v), 0,1 % Bromphenolblau (w/v), 0,1 % Xylencyanol (w/v)

Laufpuffer für Polyacrylamid-Harnstoff-Gele: 1x TBE

7.8. DNaseI Footprinting

Um die genauen Bindestellen von TrmBL1 an den verschiedenen Promotoren bestimmen zu können, wurden DNaseI-Footprinting-Versuche durchgeführt. Dabei wird eine DNA-Matrize so lange von dem Enzym DNaseI in verschieden lange Bruchstücke zerlegt, bis sie auf ein gebundenes Protein stößt und der Verdau abbricht. Bei der anschließenden Sequenzgelelektrophorese werden

die DNA-Fragmente im elektrischen Feld proportional zu ihrer Länge aufgetrennt, und es entsteht ein kontinuierliches Bandenmuster. Dies ist aber nur unter „Single Hit“-Bedingungen möglich, das heißt, die DNaseI darf jedes DNA-Molekül nur einmal schneiden. An der Stelle jedoch, an der es zu einem Abbruch des Verdaus aufgrund eines gebundenen Proteins gekommen ist, entsteht eine Lücke, weil passende DNA-Fragmente fehlen. Ein sogenannter „Footprint“ entsteht.

7.8.1. Erstellung der DNA-Matrizen für die DNaseI Footprinting-Versuche

Die Matrizen für die Footprinting-Versuche wurden mittels PCR erzeugt. Hierzu wurden die benötigten Genbereiche mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden nach Standardprotokoll amplifiziert (siehe 7.2.1). In den meisten Fällen wurde der M13_F-FAM- mit dem M13_R-Primer verwendet. Als Matrize dienten die zuvor erzeugten pUC19-Vektoren mit den jeweiligen Genbereichen (siehe Anhang, 3). Die PCR-Produkte wurden nach Amplifikation auf einem 6%igen Polyacrylamidgel analysiert (siehe 7.6.3), mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt und ihre Konzentration bestimmt (siehe 7.3.3).

Primer zur Erstellung der DNA-Matrizen für DNaseI Footprints:

Bezeichnung	Sequenz
M13_F-FAM	5'-GCC-AGG-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-A-3'
pf0132_F-FAM	5'-ACA-GGC-CAC-CCG-CCT-ATG-CAC-GGC-3'
pf0132_+60_R	5'-ATA-TCC-CTC-CAC-TCC-CCC-ATT-CTG-3'
pf0272_FP_F-FAM	5'-GCC-TCC-TCA-AAC-ACC-CAT-CCA-3'
pf0272_FP_R	5'-GTA-ATG-AGA-TTT-GGA-TTT-TCC-3'
pf0477_+140_R	5'-CCC-TCT-TCA-AGC-TCC-AAG-TAT-TTT-G-3'
pf1085_FP_F-FAM	5'-GAC-CCC-CAC-GCC-TGA-CTC-TTT-3'
pf1085_FP_R	5'-TGG-GAG-GAA-CTT-GTT-GAG-CAT-3'
pf1476_+253_R	5'-CAT-ACG-CAT-ACA-TTG-GCC-TGT-CCT-3'
pf1784_PE	5'-TTC-AGG-TTT-ACG-ATA-GCA-3'
pf1874_+66_R	5'-AGT-TAC-GGC-GTA-GGC-TAC-CCT-CTT-3'
pf2047_F-FAM	5'-AGT-TAA-TAT-TAA-AGA-TGG-CAA-GAT-3'
pf2047_R3	5'-AAG-AAA-AAT-TGA-CAT-TTG-TTC-AGC-3'

7.8.2. Erzeugung von DNaseI Footprints

Die Reaktionsansätze besaßen ein Gesamtvolumen von je 15 μ l und enthielten DNaseI-Footprinting-Puffer sowie 1,5 μ l Glycerin, 20 ng DNA und unterschiedliche Konzentrationen an TrmBL1 bzw. Proteinpuffer. Die Ansätze wurden anschließend für 15 Minuten bei 70°C im Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg) inkubiert und danach auf 37°C abgekühlt. Die beiden Kontrollansätze mit und ohne Protein wurden mit 5 μ l Formamid versetzt und 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Zu den restlichen Ansätzen wurden 0,0005 U DNaseI gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden auch diese Ansätze mit 5 μ l Formamid versetzt und für 3 Minuten auf 95°C gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend erfolgte eine Ethanolfällung der Proben (siehe 7.1.3). Die Pellets wurden in 3 μ l Formamid aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend mit einem Sequenzstandard auf das Sequenzgel

aufgetragen. Die Herstellung des Standards erfolgte mit FAM-markierten Primern nach Protokoll des Herstellers (DNA Cycle Sequencing Kit; Jena Bioscience, Jena). Als „Stop Solution“ für den Standard wurde entgegen des Protokolls nur Formamid verwendet.

DNaseI-Verdünnungspuffer: 10 mM CaCl₂, 50 % Glycerin (v/v), 50 mM Tris/HCl pH 7,5
5x Footprinting-Salzmix: 12,5 µl MgCl₂, 1 µl EDTA, 417 µl KCl, 10 µl BSA, 200 µl Na-Hepes pH 7,5, H₂O_{bidest} ad 1 ml

7.8.3. Sequenzgelelektrophorese

Für die DNaseI Footprints wurden 4,5%ige Polyacrylamid-Harnstoffgele sowie ein spezieller DNA-Sequencer (ABI Prism 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems) verwendet. Die Gellösung wurde für jeden Lauf frisch hergestellt. Nach der Polymerisation wurde das Sequenzgel zunächst einem einstündigen Vorlauf unterzogen. Nach dem Beladen und einer anschließenden Laufzeit von 2–3 Stunden konnte das Ergebnis direkt auf dem an den DNA-Sequencer angeschlossenen PC mittels der GeneScan Analysis Software abgelesen werden.

4,5%ige Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenzgellösung (29:1): 18 g Rotiphorese Nf Harnstoff, 6 ml 10x TBE, 7,5 ml Rotiphorese Gel 30, 13 ml H₂O_{bidest}, 300 µl APS (10 %), 20 µl TEMED
Laufpuffer für Sequenzgele: 1x TBE, 4 % Glycerin (v/v)

8. Proteinbiochemische Verfahren

8.1. Zellaufschluss und Hitzefällung

Die gefrorenen Zellpellets der Expression wurden vereinigt und in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend mit Glass Beads in ein 50 ml Falcontube überführt und 6-mal mittels FastPrep-24 (MP Biomedicals, Irvine/USA) aufgeschlossen. Anschließend wurde die Zellpräparation 30 Minuten bei 20.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-25.50; Beckman Coulter Inc., Brea/USA), um die Zellfragmente von den löslichen Bestandteilen zu trennen. Der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthielt, wurde in ein frisches Gefäß überführt; das Pellet wurde verworfen. Als nächstes folgte ein Hitzeschritt im Wasserbad von 10 Minuten bei 80°C, um einen Großteil der *E. coli*-Proteine aus dem Überstand zu entfernen. Die hitzelabilen *E. coli*-Proteine denaturierten und fielen als weiße Flocken aus, die thermostabilen *P. furiosus*-Proteine blieben in Lösung. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 20.000 rpm für 30 Minuten (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-25.50; Beckman Coulter Inc., Brea/USA) konnten die denaturierten Proteine vom restlichen Lysat getrennt werden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, und die Proteine anschließend über chromatographische Verfahren gereinigt.

Waschpuffer pH 7,5: 50 mM Natriumphosphatpuffer (0,5 M), 500 mM NaCl, 40 mM Hepes, 5 mM Glucose, 50 mM Imidazol, 15 %Glycerin (v/v)

8.2. Chromatographien

Die Proteinaufreinigungen wurden mit einem ÄKTApurifier 12 von GE Healthcare (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Da frühere Aufreinigungsversuche zeigten, dass TrmB leicht während der Präparation und bei längerer Lagerung denaturiert, wurden sowohl dem Wasch- als auch dem Elutionspuffer 15 % Glycerin sowie 5 mM Glucose zur Stabilisierung hinzugefügt.

8.2.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um eine selektive Trennungsmethode, welche auf der Interaktion zweier Reaktionspartner beruht. Durch Nitrilotriessigsäure-Reste werden die Ni^{2+} -Ionen an eine Säulenmatrix gebunden und können mit dem Histidin-Tag eines zu reinigenden Proteins reagieren. Das Protein wird fest an die Säulenmatrix gebunden und erst wieder mit einem Puffer, der eine hohe Konzentration an Imidazol enthält, eluiert. Dies geschieht durch Konkurrenz des Imidazols mit dem Protein um die Bindung an die Ni^{2+} -Ionen der Matrix. Zur Reinigung des Proteins wurde die HisTrap FF-Säule mit 1 ml Bettvolumen (GE Healthcare, Uppsala/Schweden) zunächst mit Waschpuffer äquilibriert und anschließend der hitzegefällte Rohextrakt nach Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 μm , Celluloseacetatmembran; VWR, Radnor/USA) auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde gesammelt und später auf einem SDS-Gel analysiert (siehe 8.4). Um ungebundenes Protein zu entfernen, wurde die Säule anschließend mit 2 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, in 4 Fraktionen gesammelt und später ebenfalls auf einem SDS-Gel analysiert. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer und wurde in einer Fraktion von 1-2 ml gesammelt. 2 μl der Fraktion wurden später in der SDS-PAGE mit aufgetragen. TrmB lief dabei im Vergleich zu einem Proteinstandard auf einer Höhe von 38 kDa, TrmBL1 bei 39,4 kDa und aMBF1 bei 24 kDa.

0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5: 72 g Na_2HPO_4 , 13,1 g NaH_2PO_4 , $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 1000 ml

Waschpuffer pH 7,5: 50 mM Natriumphosphatpuffer (0,5 M), 500 mM NaCl, 40 mM Hepes, 5 mM Glucose, 50 mM Imidazol, 15 %Glycerin (v/v)

Elutionspuffer pH 7,5: 50 mM Natriumphosphatpuffer (0,5 M), 500 mM NaCl, 40 mM Hepes, 5 mM Glucose, 500 mM Imidazol, 15 %Glycerin (v/v)

8.2.2. Gelfiltrationschromatographie

Zur weiteren Reinigung und Entsalzung der durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinlösung wurde die gesamte Elutionsfraktion auf eine HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade-Säule mit einem Bettvolumen von 120 ml (GE Healthcare, Uppsala (Schweden)) aufgetragen und eine Gelfiltration durchgeführt. Zunächst wurde der Proteinpuffer jedoch filtriert (ME 25 Membranfilter, Cellulosemischester, 0,45 μm ; Whatman, Dassel) und die Säule vor dem Probenaufrag mit 3-5 Säulenvolumen des Proteinpuffers equilibriert. Die Injektion der Proteinlösung erfolgte mit einem maximalen Volumen von 2 % des Bettvolumens, die Elution mit einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min über 1,5 Säulenvolumen. Die Proteine wurden während des Laufs durch Messung der Absorption bei 280 nm nachgewiesen und in 1,5-ml-Eluat fraktioniert in 96-Well-Platten gesammelt. Proben von in Frage kommenden Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE analysiert (siehe 8.4). Die Fraktionen mit dem Zielprotein wurden

vereinigt und das Gesamtvolumen mittels Konzentratoren (Vivaspin20, MWCO 30.000; Sartorius, Göttingen) nach Herstellerprotokoll auf 1-1,5 ml reduziert.

Proteinpuffer pH 7,5: 25 mM Hepes, 300 mM NaCl, 15 % Glycerin (v/v)

8.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test verwendet. Dabei bilden Proteine in saurer Lösung Komplexe mit Coomassie Brilliant Blue G250, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 auf 595 nm verschiebt. Aus der Absorptionzunahme bei 595 nm lässt sich somit die Proteinkonzentration der Lösung photometrisch bestimmen. Zunächst muss eine Eichgerade mit BSA erstellt werden. Dazu werden, neben dem Nullwert ohne BSA, zweimal vier Standards mit 2, 4, 8 und 12 ng BSA in je 100 μ l Proteinpuffer hergestellt und jeder Ansatz mit 900 μ l Coomassie Brilliant Blue Lösung vermischt. Neben den Standards wurden noch eine 1:10- und eine 1:20-Verdünnung der zu bestimmenden Proteinlösung in je 100 μ l Proteinpuffer erstellt und ebenfalls mit 900 μ l Coomassie Brilliant Blue Lösung gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die OD₅₉₅-Werte mit einem Spektralphotometer (Beckman DU-640; Beckman Coulter Inc., Brea/USA) gemessen werden. Für die Eichgerade wurden jeweils die Mittelwerte der beiden Ansätze berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen. Anhand der OD₅₉₅-Werte und der Eichgerade konnte anschließend die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden. Die Lagerung der Proteine erfolgte im Kühlschrank oder aliquotiert bei -20°C.

Coomassie Brilliant Blue Lösung: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml Ethanol (95 %), 100 ml Phosphorsäure (85 %), H₂O_{bidest} ad 1000 ml

8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der „Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ (SDS-PAGE) handelt es sich um eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht [Shapiro *et al.*, 1967, Laemmli, 1970]. Darüber hinaus hilft die Verwendung eines Proteinstandards dabei, die Untereinheitenzusammensetzung oder die Reinheit eines Proteins in einer Lösung einzuordnen. Durch das anionische Detergenz SDS werden alle nichtkovalenten Wechselwirkungen der nativen Proteinstruktur aufgehoben und die Proteine somit entfaltet. Gleichzeitig erhalten die Polypeptide eine starke negative Ladung, so dass die Eigenladung aufgrund der Aminosäurezusammensetzung vernachlässigbar gering wird. Die negative Gesamtladung führt dazu, dass die Proteine im elektrischen Feld einheitlich vom Minus- zum Pluspol wandern und eine Auftrennung ausschließlich aufgrund des Molekulargewichts erfolgt. Neben SDS spielt auch noch das Reduktionsmittel Dithiothreitol eine wichtige Rolle. Dieses bewirkt die Aufspaltung von Disulfidbrücken und trägt ebenfalls dazu bei, die Proteine zu entfalten. Bei der SDS-PAGE spricht man zudem von einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese, da das Proteingemisch zunächst in einem weitporigen Sammelgel aufkonzentriert und anschließend in einem engporigen Trenngel der Größe nach aufgetrennt wird. In dieser Arbeit wurden 12%ige Trenn- und 4%ige Sammelgele verwendet. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben (je 20 μ l) mit 2x Auftragspuffer

versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Um die Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthalten, identifizieren zu können, wurde zudem ein Protein-Standard (PageRuler Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern (Mini-PROTEAN Tetra Cell; Bio-Rad, München) mit 1x SDS-Laufpuffer bei 25 mA/200 V bis zum Auslauf der Bromphenolblaubande.

1,5 M Trenngelpuffer pH 8,8: 1,5 M Tris, 0,4 % SDS (w/v)

0,5 M Sammelgelpuffer pH 6,8: 0,5 M Tris, 0,4 % SDS (w/v)

12%iges Trenngel: 3 ml Rotiphorese Gel 30, 2,7 ml H₂O_{bidest}, 1,9 ml Trenngelpuffer pH 8,8, 25 µl APS (10 %), 5 µl TEMED

4%iges Sammelgel: 0,5 ml Rotiphorese Gel 30, 2,4 ml H₂O_{bidest}, 1 ml Sammelgelpuffer pH 6,8, 25 µl APS (10 %), 4 µl TEMED

2x Auftragspuffer: 10 ml Tris/HCl pH 6,8 (1,5 M), 6 ml SDS (20 %), 30 ml Glycerin, 15 ml β-Mercaptoethanol, 1,8 mg Bromphenolblau, H₂O_{bidest} ad 100 ml

10x SDS-Laufpuffer: 144,1 g Glycin, 10 g SDS, 30,3 g Tris, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Um die Proteine zu fixieren und die Banden auf dem Gel sichtbar machen zu können, wurden diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in einer Coomassie-Blau Färbelösung [Meyer und Lamberts, 1965] inkubiert und anschließend wiederholt in Entfärbelösung gegeben. Die Proteine wurden daraufhin als blaue Banden im Gel sichtbar und konnten anhand des Proteinstandards identifiziert werden.

Coomassie-Blau Färbelösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

Coomassie-Blau Entfärbelösung: 100 ml Essigsäure, 450 ml Methanol, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

9. Organismische Methoden

9.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Anzucht diverser *E. coli*-Stämme wurde Luria-Bertani (LB)-Medium [Sambrook *et al.*, 1989] verwendet. Dieses lag autoklaviert (20 min, 121°C) entweder als 5-ml-Flüssigmedium in Reagenzgläsern und als 30- bzw. 400-ml-Flüssigmedium in 100-ml- bzw. 2-L-Schüttelkolben vor oder als fester Agar-Nährboden in Petrischalen. Wurden plasmidhaltige Stämme verwendet, musste dem Flüssigmedium bzw. den Agar-Platten je nach Bedarf Ampicillin (Ek = 100 µg/ml) oder Chloramphenicol (Ek = 25 µg/ml) bzw. eine Kombination aus diesen zugegeben werden. Die Flüssigkulturen wurden zudem auf einem Schüttler bei 150 rpm oder in einem Rollrad (Roller Drum; New Brunswick/Eppendorf, Enfield/USA) inkubiert, um eine stetige Versorgung mit frischem Sauerstoff zu gewährleisten. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Zellen aus dem Flüssigmedium auf feste LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der *E. coli*-Kulturen erfolgte aerob bei 37°C zumeist über Nacht.

LB-Flüssigmedium pH 7,0: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, H₂O_{bidest} ad 1000 ml

1,5%ige LB-Agarplatten pH 7,0: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ ad 1000 ml

9.1.1. Expression von Proteinen

Die Expressionsstämme zu den Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 sowie diverser Mutanten lagen zum Teil zu Beginn der Arbeit als fertige Konstrukte vor. Der Expressionsstamm zum Transkriptionsfaktor PF0512 wurde im Laufe dieser Arbeit erstellt (siehe 7.4.7).

Um die Proteine exprimieren zu können, wurden zunächst zwei 30-ml-Vorkulturen in LB_{Amp} -Flüssigmedium angelegt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden vier 2-L-Erlenmeyerkolben mit 400 ml LB_{Amp} -Flüssigmedium mit jeweils 6 ml der Vorkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Da in den Expressionsansätzen lac-Promotoren verwendet wurden, mussten den *E. coli*-Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{578} = 0,5-0,8$) IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben werden, um die Expression des gewünschten Proteins zu induzieren. Nach Zugabe von IPTG wurden die Kulturen für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend durch Zentrifugation geerntet (20 min bei 6.000 rpm; Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-10; Beckman Coulter Inc., Brea/USA) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Zudem wurde unmittelbar vor und jede Stunde nach IPTG-Zugabe 1 ml Zellkultur entnommen und in einer Tischzentrifuge (Mikro 120; Hettich Lab Technology, Tuttlingen) pelletiert (10 min bei 11.000 rpm). Die Pellets wurden anschließend in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ resuspendiert. Davon wurde später 1 μl in einer SDS-PAGE analysiert (siehe 8.4).

9.2. Kultivierung von *Pyrococcus furiosus*

Das in dieser Arbeit verwendete Medium zur Kultivierung von *P. furiosus* beruht auf den Komponenten von synthetischem Meerwasser [Fiala und Stetter, 1986]. Zur Herstellung des Mediums wurden zunächst alle Bestandteile und Zusätze (außer Na_2S) in $\text{H}_2\text{O}_{bidest}$ gelöst, in eine 1-L-Duranglasflasche gefüllt und mit einem Gummistopfen sowie einer durchbohrten Schraubkappe (Schott GL 45) verschlossen. Anschließend wurde das Medium für 30 Minuten mit N_2 durchgast und danach der verbliebene Sauerstoff durch Zugabe des Reduktionsmittels Na_2S entfernt. Nach Überprüfung und Korrektur des pH-Wertes (Sollwert 6,5-7,0) wurde das Medium in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Arbor/USA) in 20-ml-Portionen in 120-ml-Serumflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas; Stute GmbH, Rheinbreitbach) abgefüllt und mit einem Gummistopfen sowie einem Metallring verschlossen. Zum Schluss wurden die Serumflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und N_2 mit 2 bar aufgedrückt. Eine Sterilisation erfolgte im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten. Bei der Herstellung der Gelriteplatten wurde im Gegensatz zum Flüssigmedium kein Resazurin verwendet. Alle weiteren Bestandteile blieben gleich und es wurden zusätzlich 1,5 % Gelrite (w/v) zugegeben. Nach Durchgasung, Reduktion mit Na_2S und pH-Kontrolle wurde die Suspension in Druckflaschen autoklaviert. Anschließend wurde das noch heiße Medium (90°C) teilentgast und in die Anaerobenkammer eingeschleust. Nach einem kurzen Rührschritt wurde es zügig in anaerobe Petrischalen gegossen (Volumen ca. 30 ml). Die Lagerung der Gelriteplatten erfolgte bis zur Verwendung in der Anaerobenkammer.

SME		10x Wolfe's Mineralien pH 1,0	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
NaCl	473,99 mM	NaCl	171,10 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	28,4 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	121,70 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	27,1 mM	MnSO ₄ x H ₂ O	29,60 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5,1 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	6,80 mM
KCl	8,7 mM	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3,60 mM
NaBr	0,97 mM	CoSO ₄ x 7 H ₂ O	6,40 mM
H ₃ BO ₃	0,49 mM	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	6,30 mM
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,056 mM	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,40 mM
KJ-Lsg., 0,1%ig	0,30 µM	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,38 mM
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml	H ₃ BO ₃	1,63 mM
		Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,41 mM
		(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	7,09 mM
		Na ₂ SeO ₄	0,53 mM
		Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,30 mM
		H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

1/2 SME-Medium		Zusätze	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
SME	500 ml	Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Pepton	0,1 % (w/v)
Na ₂ S x 3 H ₂ O	0,3 g	Stärke	0,1 % (w/v)
10x Wolfe's Mineralien pH 1,0	1 ml		
Resazurin, 0,1%ig	1 ml		
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml		

Die Zugabe von Simvastatin erfolgte stets vor Verwendung des jeweiligen Mediums. Die Inkubationstemperatur betrug 85°C, nur die Vorkulturen zur Transformation wurden bei 75°C in Thermoinkubatoren angezogen.

III. Ergebnisse

1. TrmB und TrmBL1 besitzen keine multiplen DNA-Bindehelices in ihrer DNA-Bindedomäne

TrmB und TrmBL1 sind in der Lage an verschiedene Zielpromotoren zu binden und somit deren Transkription zu regulieren. Hierfür werden unterschiedliche Nukleotidsequenzen in der Promotorregion des jeweiligen Gens spezifisch erkannt. Dabei ist TrmB der Hauptregulator des TM- und TrmBL1 der Hauptregulator des MD-Promotors. In früheren Versuchen konnte zudem eine Cross-Regulation von TrmB und TrmBL1 an den beiden Promotoren beobachtet werden [Surma, 2011]. Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass beide Proteine möglicherweise mit unterschiedlichen Bindehelices an die verschiedenen Promotorbereiche binden und somit eine differenzielle Regulation der Transkription ermöglicht wird. Erste Sequenzanalysen hoben zwei HTH-Motive am N-Terminus hervor (siehe Abb. III.1). Bei TrmB erstreckt sich das erste HTH-Motiv (HTH-1) von Aminosäure 33-54; bei TrmBL1 handelt es sich um die AS 32-53. Das zweite HTH-Motiv (HTH-2) geht bei TrmB von AS 83-104 und bei TrmBL1 von AS 80-99. Um für die DNA-Bindung relevante Aminosäuren identifizieren zu können, wurden Mutationsanalysen der entsprechenden HTH-Motive durchgeführt. Dazu wurden mehrere Punktmutanten erstellt und auf ihre Transkriptionsfähigkeit hin getestet. Erste Versuche mit den Punktmutanten TrmB E37A, Y50N, T52K, E87A, E96A/E98A und E105A/E106A sowie TrmBL1 E40N, D50N, E81A und E85A/D86A ließen vermuten, dass tatsächlich zwei verschiedene Bindehelices für die Regulation der Transkription verantwortlich sind [Surma, 2011]. Da sowohl HTH-1 als auch HTH-2 in TrmB und TrmBL1 große AS-Sequenzidentität zueinander besitzen (30-45 %) (siehe Abb. III.1), sollten in dieser Arbeit die jeweiligen Helices beider Proteine gegeneinander ausgetauscht und die daraus resultierende Wirkung auf die *in vitro* Transkription getestet werden.

1.1. Versuche mit TrmB- und TrmBL1-Helixmutanten

Ausgangspunkt zu diesen Versuchen waren vorangegangene *in vitro* Transkriptionen mit Punktmutanten von Frau Dr. Melanie Surma [Surma, 2011]. In diesen Transkriptionen stellten sich vor allem die Punktmutanten TrmB Y50N, bei der das Tyrosin an Position 50 durch ein Asparagin ersetzt wurde, und TrmB E87A, mit einem Alanin anstatt des Glutamats an Position 87, als besonders interessant heraus. TrmB Y50N wies eine starke Reduktion der Bindungsfähigkeit zum TM-Promotor auf, wohingegen die Bindungsfähigkeit zum MD-Promotor kaum eingeschränkt war. Bei der Punktmutante TrmB E87A hingegen waren die Ergebnisse genau anders herum. Diese hatte ihre Bindungsfähigkeit zum MD-Promotor nahezu vollständig verloren, wohingegen die Transkription am TM-Promotor mit der gleichen Effizienz wie Wildtyp-TrmB inhibiert wurde. Daraus folgte, dass TrmB mit HTH-1 an den TM-Promotor und mit HTH-2 an den MD-Promotor bindet.

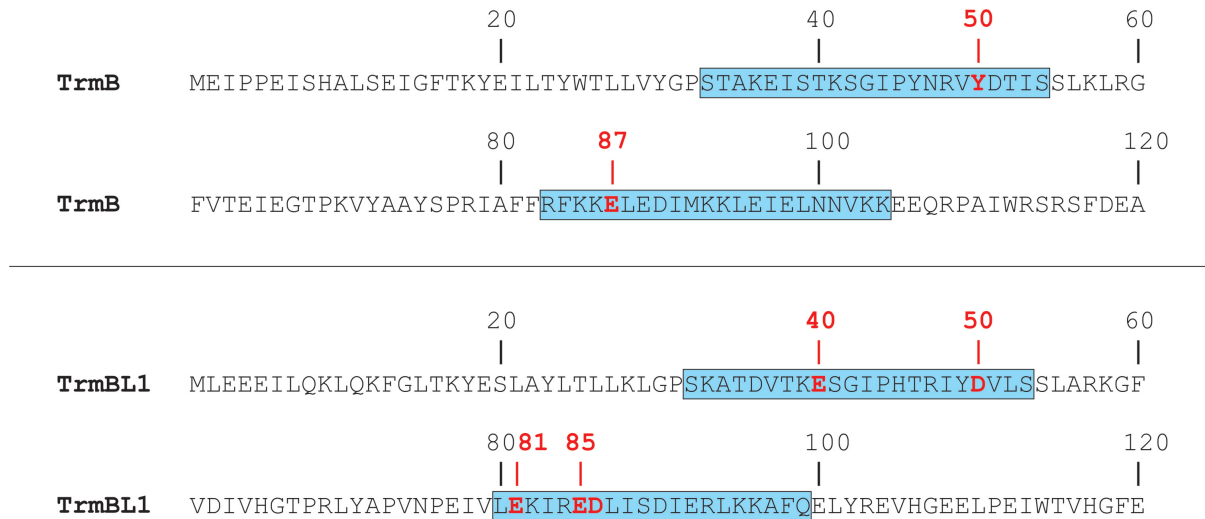


Abbildung III.1.: **Aminosäuresequenzen der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB und TrmBL1.** Die in Frage kommenden HTH-Strukturen sind mit einem blauen Kästchen gekennzeichnet. Die Aminosäuren, welche sich in Transkriptionsversuchen als für die DNA-Bindung relevant herausstellten, sind rot hervorgehoben.

Auch zwei TrmBL1-Punktmutanten stellten sich als sehr interessant heraus. Zum einen TrmBL1 D50N, bei dem das Aspartat an Position 50 gegen ein Asparagin ersetzt wurde; zum anderen TrmBL1 E81A, das ein Alanin anstatt des Glutamats an Position 81 besitzt. In *in vitro* Transkriptionen am PFK-Promotor (*pf1784*, mit TGM) und am TrmBL1-Promotor (*pf0124*, ohne TGM) zeigte sich, dass TrmBL1 D50N nicht mehr in der Lage war, an den PFK-Promotor zu binden, wohingegen die Repression der Transkription am TrmBL1-Promotor nicht beeinträchtigt wurde. Versuche mit der TrmBL1 E81A-Mutante zeigten das genaue Gegenteil. Während die Transkription am PFK-Promotor durch TrmBL1 E81A nach wie vor reprimiert wurde, konnte kein Einfluss des mutierten Proteins auf die Transkription am TrmBL1-Promotor mehr festgestellt werden. Dies bedeutete, dass TrmBL1 mit HTH-1 an Promotoren mit TGM bindet, wohingegen HTH-2 für eine Bindung an Promotoren ohne TGM benötigt wird [Surma, 2011]. Um festzustellen, ob wirklich die verschiedenen Helices der beiden Proteine für diesen Effekt verantwortlich sind, wurden die HTH-1-Bindungsmotive von TrmB und TrmBL1 vertauscht und die so mutierten Proteine auf ihre Transkriptionsfähigkeit hin getestet.

1.1.1. *In vitro* Transkriptionen am TM-Promotor

In vitro Transkriptionen am TM-Promotor werden bereits ab einer Konzentration von 0,5 μ M TrmB wt reprimiert (Abb. III.2 a, Spur 2), wohingegen eine Repression durch TrmBL1 wt erst ab einer Konzentration von 2,5 μ M eintritt (Abb. III.2 b, Spur 6). Sollten beide Proteine mit unterschiedlichen Helices an die DNA binden (TrmB mit HTH-1 und TrmBL1 mit HTH-2 [Surma, 2011]), müsste der Austausch von HTH-1 dazu führen, dass das mutierte TrmB mit HTH-1 von TrmBL1 in seiner Bindungsfähigkeit TrmBL1 wt ähnelt, wohingegen die Transkription mit TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB zu einer ähnlichen Repression wie TrmB wt führen sollte.

Wie die Abbildungen III.2 c und d zeigen, ist genau dies am TM-Promotor der Fall. Das mutierte *TrmBL1* mit HTH-1 von *TrmB* reprimiert bereits ab einer Konzentration von 0,5 μM die Transkription am TM-Promotor (Abb. III.2 c, Spur 2), wohingegen *TrmB* mit HTH-1 von *TrmBL1* erst ab einer Konzentration von 2,5 μM repressiv wirkt (Abb. III.2 d, Spur 6).

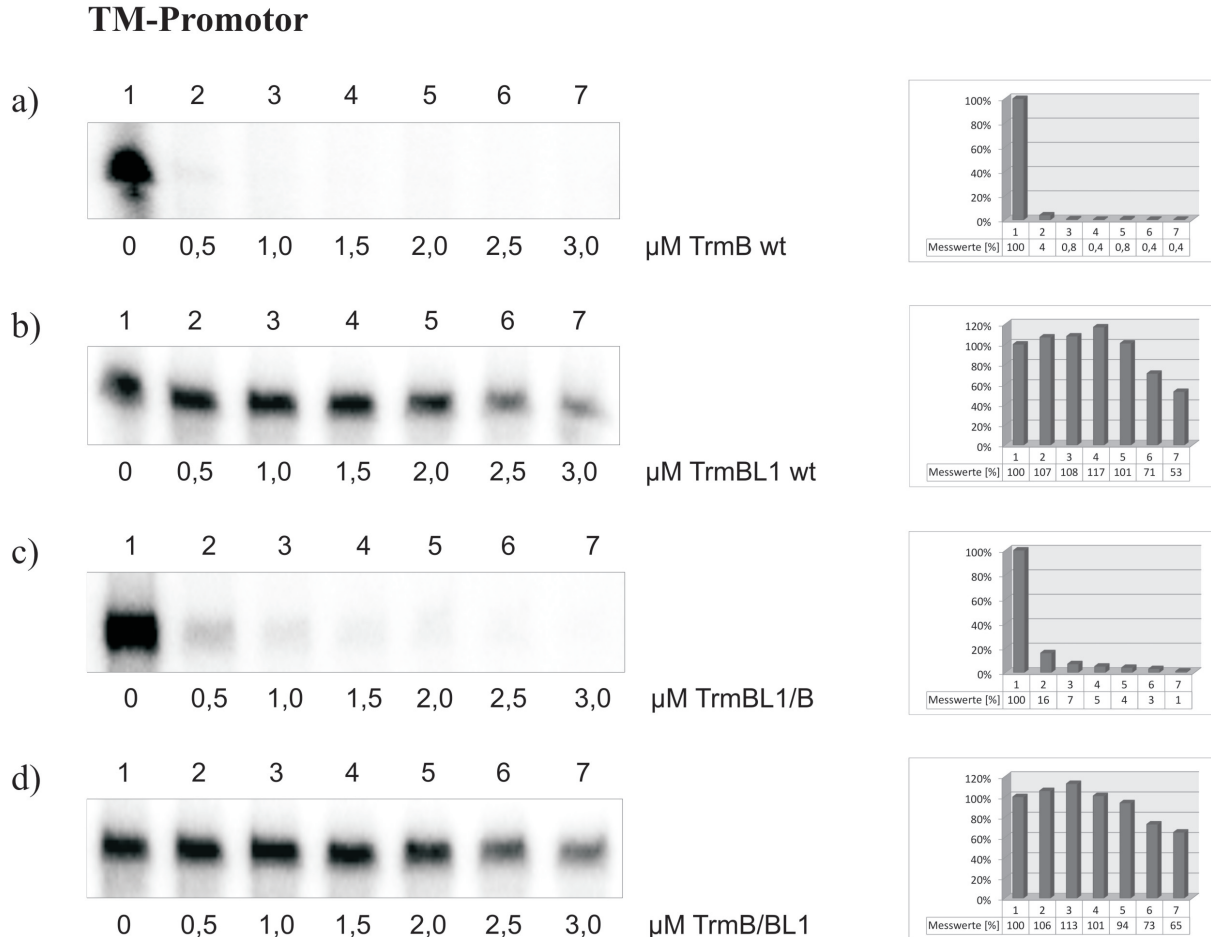


Abbildung III.2.: ***In vitro* Transkriptionen mit *TrmB*- und *TrmBL1*-Wildtyp sowie deren Helixmutanten am TM-Promotor.** Abbildung (a) zeigt die *in vitro* Transkription mit dem Hauptregulator *TrmB*, Abbildung (b) die mit *TrmBL1*. In (c) und (d) sind die Transkriptionen mit den beiden Helixmutanten „*TrmBL1* mit HTH-1 von *TrmB*“ und „*TrmB* mit HTH-1 von *TrmBL1*“ abgebildet. In allen Transkriptionen wurden die *TrmB*-Proteine in Konzentrationen von 0-3,0 μM zugegeben. Die jeweiligen Signalstärken der Transkriptionen sind rechts daneben in einem Balkendiagramm wiedergegeben. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe eines Regulators entspricht immer 100 %.

1.1.2. *In vitro* Transkriptionen am MD-Promotor

Betrachtet man nun die Transkription am MD-Promotor, so kann festgestellt werden, dass hier eine deutliche Repression (ca. 50 %) durch *TrmB* wt erst ab einer Konzentration von 2,0 μM eintritt (Abb. III.3 a, Spuren 5-7). *TrmBL1* wt hingegen reprimiert die Transkription bereits ab 0,5 μM (Abb. III.3 b, Spur 2). Auch hier sollte ein Helixtausch der beiden Proteine Auswirkungen auf die Transkription haben. Da *TrmB* an diesem Promotor mit HTH-2 bindet,

sollte ein Austausch der ersten Helix zu einer verstärkten Repression der Transkription führen, ähnlich zu TrmBL1 wt. Dieses bindet laut früheren Transkriptionen mit HTH-1 an das TGM des MD-Promotors [Surma, 2011]. Ein Austausch der Helix HTH-1 in TrmBL1 sollte folglich eine Repression der Transkription am MD-Promotor ähnlich zu TrmB wt zeigen.

In vitro Transkriptionen mit mutiertem TrmB, welches das HTH-1 von TrmBL1 besitzt, zeigen jedoch eine Bindungsfähigkeit, die sehr stark dem TrmB wt ähnelt (Abb. III.3 d). Eine Repression der Transkription ist erst ab einer Konzentration von 1,5 μ M zu sehen (Spur 4). Auch der Austausch von HTH-1 in TrmBL1 sollte ein ähnliches Bild zu TrmB wt zeigen. Hier ist jedoch eine deutliche Verbesserung der Bindungsfähigkeit von TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB gegenüber TrmB wt zu erkennen. Eine deutliche Repression (> 50 %) findet bereits ab einer Konzentration von 1,0 μ M statt (Abb. III.3 c, Spur 3).

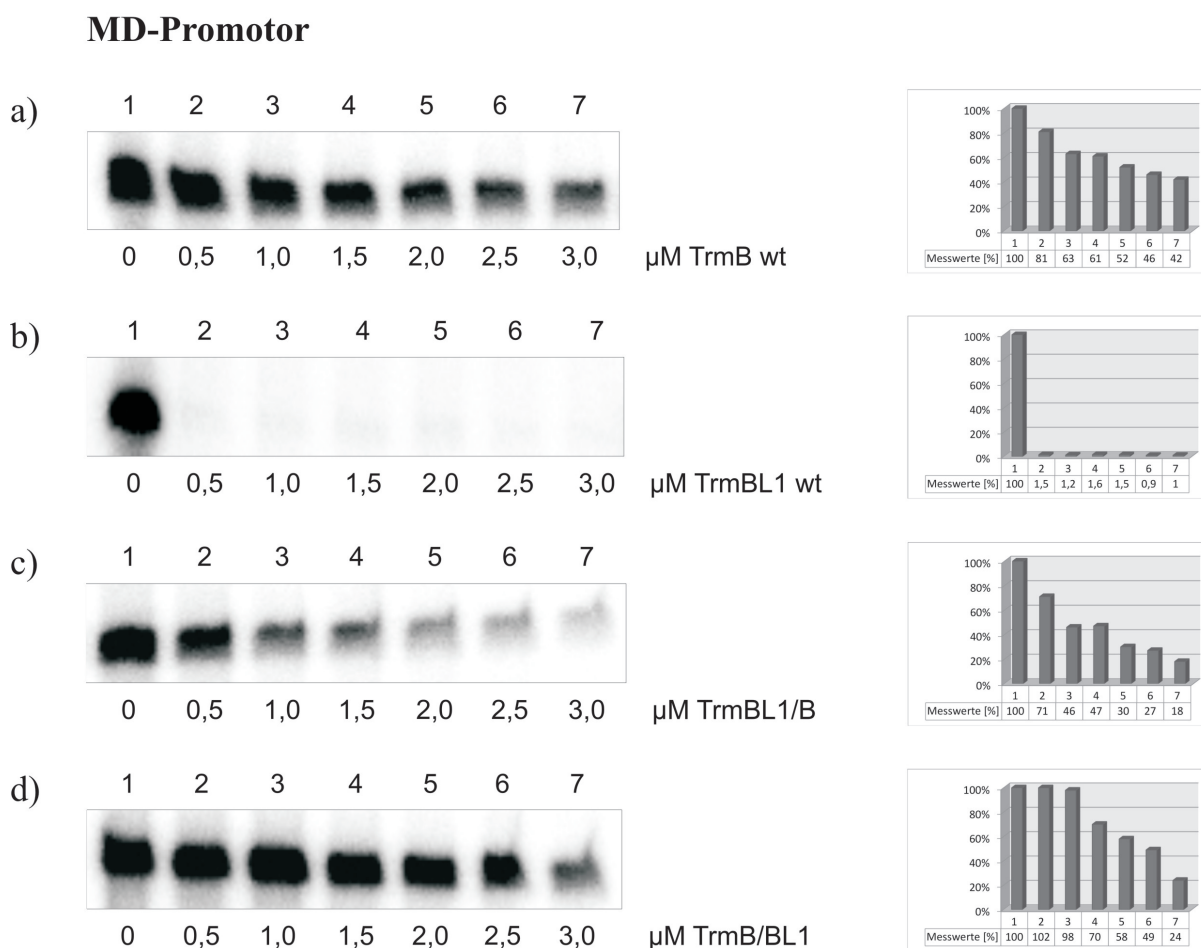


Abbildung III.3.: *In vitro* Transkriptionen mit TrmB- und TrmBL1-Wildtyp sowie deren Helixmutanten am MD-Promotor. Abbildung (a) zeigt die *in vitro* Transkription mit TrmB, Abbildung (b) die mit dem Hauptregulator TrmBL1. In (c) und (d) sind die Transkriptionen mit den beiden Helixmutanten „TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB“ und „TrmB mit HTH-1 von TrmBL1“ abgebildet. In allen Transkriptionen wurden die TrmB-Proteine in Konzentrationen von 0-3,0 μ M zugegeben. Die jeweils gemessenen Signalstärken der Transkriptionen sind rechts daneben in einem Balkendiagramm wiedergegeben. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe eines Regulators entspricht immer 100 %.

Da die ersten Versuche nicht die gewünschten Ergebnisse lieferten und eine neue Kristallstruktur von TrmB auf einen anderen Mechanismus hindeutet, wurde auf weitere Transkriptionen mit den HTH-2-Mutanten von TrmB und TrmBL1 verzichtet. Auch geplante *in vivo* Versuche mit den Punktmutanten (D50N und E81A) sowie der Doppelmutante (D50N/E81A) von TrmBL1 wurden nicht durchgeführt. Es wurde jedoch überprüft, ob eine Deletion des *trmBL1*-Gens Auswirkungen auf den Phänotyp bzw. das Wachstumsverhalten des Stammes besaß.

2. *In vivo* Versuche zu TrmBL1 mit *Pyrococcus furiosus*

2.1. Erstellung der TrmBL1-modifizierten *P. furiosus* Stämme MURPf33-36

Mit Hilfe des von Frau Dr. Ingrid Waage etablierten Transformationssystems wurde eine Simvastatinresistenz in *P. furiosus* eingebracht sowie eine TrmBL1-Deletionsmutante ($\Delta trmBL1$) mit der gleichen Antibiotikaresistenz erstellt, um mögliche Einflüsse des Antibiotikums auf das Wachstum der Stämme ausschließen zu können. Des Weiteren wurden drei TrmBL1-Mutanten erstellt. Die erste besitzt eine Punktmutation in der ersten Bindehelix (HTH-1) von TrmBL1, mit einem Aminosäuretausch von Asparaginsäure zu Asparagin (D50N). Die zweite hat eine Punktmutation in der zweiten Bindehelix (HTH-2) von TrmBL1, mit einem Austausch von Glutaminsäure zu Alanin (E81A). Bei der dritten Mutante handelt es sich um eine D50N/E81A-Doppelmutante. Die homologen Rekombinationen zur Erzeugung der Mutanten erfolgten nach dem gleichen Schema wie für MURPf33 (siehe III.4, a)

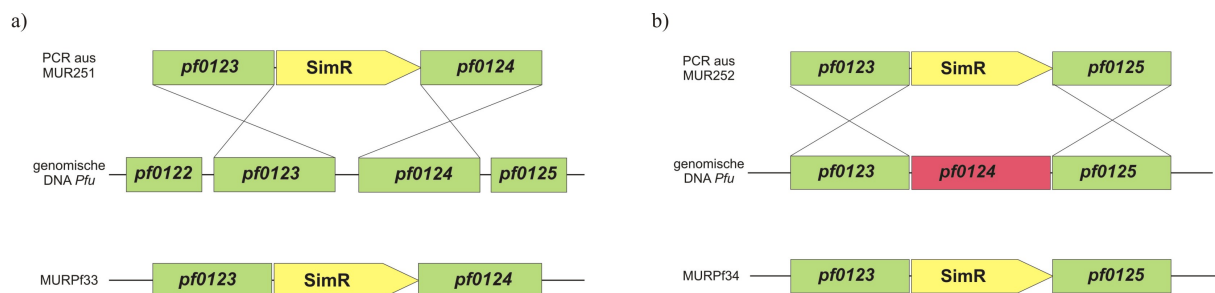


Abbildung III.4.: **Erzeugung von *P. furiosus* MURPf33 und MURPf34.** Die durch Fusions-PCRs konstruierten Fragmente enthalten stromauf- und -abwärts flankierende Sequenzen von *pf0124* (grün hinterlegte Genbereiche) sowie die Simvastatin-Resistenzkassette (gelb hinterlegter Bereich). Das für die TrmBL1-Deletionsmutante entfernte *pf0124*-Gen ist in rot dargestellt. Durch Transformation, homologe Rekombination und Simvastatin-Selektion wurden so die *P. furiosus*-Stämme MURPf33 (a) und MURPf34 (b) erzeugt.

2.2. Wachstumsanalysen zu MURPf33 und MURPf34

In vitro Versuche zu TrmBL1-regulierten Genen konnten zeigen, dass TrmBL1 nicht nur an der Regulation des Zuckerstoffwechsels sondern auch an anderen Metabolismen in *P. furiosus* beteiligt ist. Um dies auch *in vivo* nachweisen zu können, wurde eine TrmBL1-Deletionsmutante hergestellt und etabliert. Mit dieser wurden Wachstumsanalysen auf 1/2 SME-Medium mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pepton sowie 10 μ M Simvastatin durchgeführt, um festzustellen, ob die Deletion des Proteins einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten bzw. den Phänotyp

besitzt. Für die Kurven wurden je zwei Ansätze in 20 ml Medium verwendet und deren Wachstum bei 85°C über 12 Stunden protokolliert. Die Ausgangszelldichte betrug etwa $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die Zelldichte der Kulturen wurde anschließend alle zwei Stunden mittels Thoma-Zählkammer (0,02 mm Tiefe; Marienfeld, Lauda-Königshofen) berechnet und daraus die Mittelwerte gebildet.

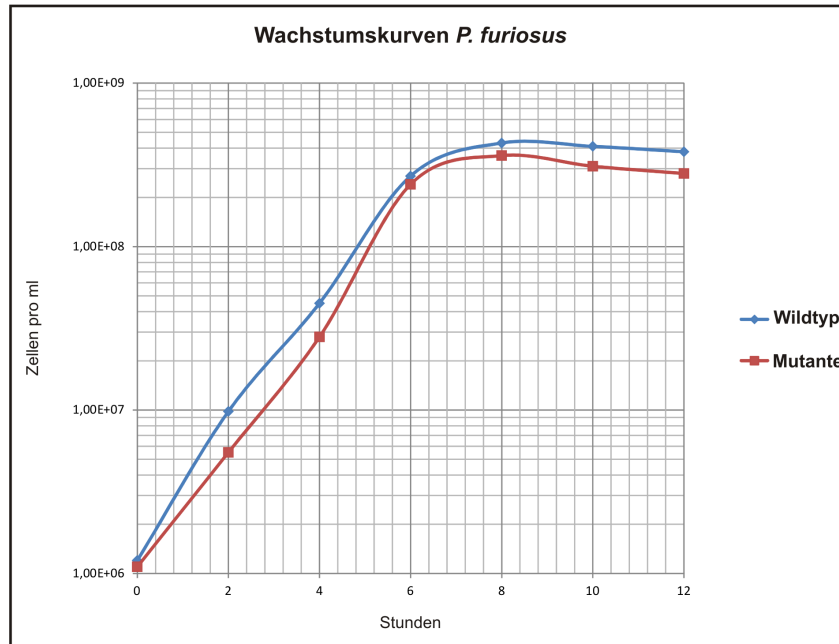


Abbildung III.5.: Wachstumskurven von *P. furiosus* MURPf33 (Wildtyp) und MUR-Pf34 ($\Delta trmBL1$ -Mutante).

Die Mikroskopie der Zellen des Wildtyps im Vergleich zu denen der Deletionsmutante zeigte, dass die Zellen der Mutante signifikant kleiner waren als die des Wildtyps. Im Wachstumsverhalten konnte jedoch kein großer Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante beobachtet werden. Sowohl der Wildtyp als auch die Deletionsmutante vermehrten sich mit nahezu gleicher Wachstumsrate und erreichten annähernd gleiche Zelldichten. Die Maximalrate betrug im Wildtypstamm $4,3 \cdot 10^8$ und im Deletionsstamm $3,6 \cdot 10^8$ Zellen/ml (siehe Abb. III.5). Auf weitere Versuche mit den Punktmutanten TrmBL1 D50N und E81A sowie der Doppelmutante TrmBL1 D50N/E81A wurde verzichtet, da sich die Hypothese der verschiedenen Bindehelices von TrmBL1 zur Regulation der Transkription nicht bestätigen ließ und bereits die Deletionsmutante keine nennenswerten Unterschiede im Wachstumsverhalten zeigte.

3. Neue TrmBL1-regulierte Gene

Durch ChIP-Seq Analysen von Robert Reichelt wurden neue *in vivo* Bindestellen von TrmBL1 an die genomische DNA von *Pyrococcus furiosus* entdeckt. Darunter befanden sich sowohl Gene, die nichts mit dem Zuckerstoffwechsel von *P. furiosus* gemein haben, als auch komplett unbekannte Gene, die für hypothetische Proteine kodieren. Was jedoch alle Promotoren gemeinsam hatten, war die Tatsache, dass alle ein TGM vor, bei oder hinter der BRE/TATA-Box beinhalteten. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 19 verschiedene Promotoren in verschiedenen *in vitro* Ver-

suchen getestet. Um die Bindung und Wirkung von TrmBL1 an den einzelnen Promotoren feststellen zu können, wurden mit nahezu allen Promotoren sowohl EMSAs als auch *in vitro* Transkriptionen durchgeführt. An einzelnen Promotoren wurden DNaseI Footprints erstellt, um die genaue Bindestelle nachweisen zu können.

Gen	Genname	TGM
pf0043	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	downstream
pf0132	α -Glucosidase	downstream
pf0196	Phosphoglucose-Isomerase	downstream
pf0272	4- α -Glucanotransferase	downstream
pf0287	Pyrolysin	upstream
pf0477	extrazelluläre α -Amylase	downstream
pf0588	Phosphoglucose-Mutase	downstream
pf0613	Fructose-1,6-Bisphosphatase	upstream
pf0648	Hypothetisches Protein	upstream
pf0967	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase UE δ	downstream
pf1085.1n	Hypothetisches Protein	downstream
pf1109	Hypothetisches Protein, Stärke-bindend	downstream
pf1350	Hypothetisches Protein, möglicher Transporter	downstream
pf1476	vermuteter Transkriptionsregulator, PadR-Familie	downstream
pf1602	Glutamat-Dehydrogenase	Nein
pf1784	Phosphofruktokinase	downstream
pf1874	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	upstream
pf1938	Maltodextrin-Bindeprotein (MD-System, <i>malE</i>)	downstream
pf2047	L-Asparaginase	upstream

Abbildung III.6.: Übersicht der getesteten Promotoren auf Regulation durch TrmBL1. Bereits bekannte Gene sind in grün dargestellt und wurden in dieser Arbeit meist als Kontrollen verwendet. Gelb sind Gene markiert, die bereits als mögliche Ziele der TrmBL1-Regulation erwähnt wurden. In blau sind vollkommen neue Gene gekennzeichnet, welche in ChIP-Seq-Versuchen von Robert Reichelt durch TrmBL1 gebunden wurden.

3.1. EMSAs mit TrmBL1 an neu identifizierten Zielpromotoren

3.1.1. Kontroll-EMSAs mit bereits bekannten Promotoren

Zunächst wurden Kontroll-EMSAs mit dem FBPase (*pf0613*)- und dem PFK-Promotor (*pf1784*) durchgeführt, um eine einwandfreie Funktion des neu aufgereinigten TrmBL1 zu garantieren, da dessen Reinigungsprozess verändert wurde. Eine Bindung von TrmBL1 an beide Promotoren wurde bereits in einer früheren Arbeit nachgewiesen [Surma, 2011]. Zusätzlich wurde ein EMSA mit dem GDH-Promotor (*pf1602*) durchgeführt. An diesem sollte keine Bindung erkennbar sein, da der Promotor weder ein TGM besitzt noch von TrmBL1 reguliert wird.

Wie in Abbildung III.7 deutlich zu erkennen, war das neu aufgereinigte TrmBL1 in der Lage sowohl an den FBPase- (Abb. III.7, a) als auch an den PFK-Promotor (Abb. III.7, b) zu binden. Eine Konzentration von $0,13 \mu\text{M}$ TrmBL1 reichte am PFK-Promotor aus, um die gesamte DNA zu binden. Am FBPase-Promotor war für eine komplette Bindung der vorhandenen DNA die doppelte Konzentration an TrmBL1 notwendig. Am GDH-Promotor (Abb. III.7, c) war selbst ab einer Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ TrmBL1 keine Bindung an die DNA erkennbar. Dieser konnte somit für weitere *in vitro* Versuche als Negativkontrolle verwendet werden.

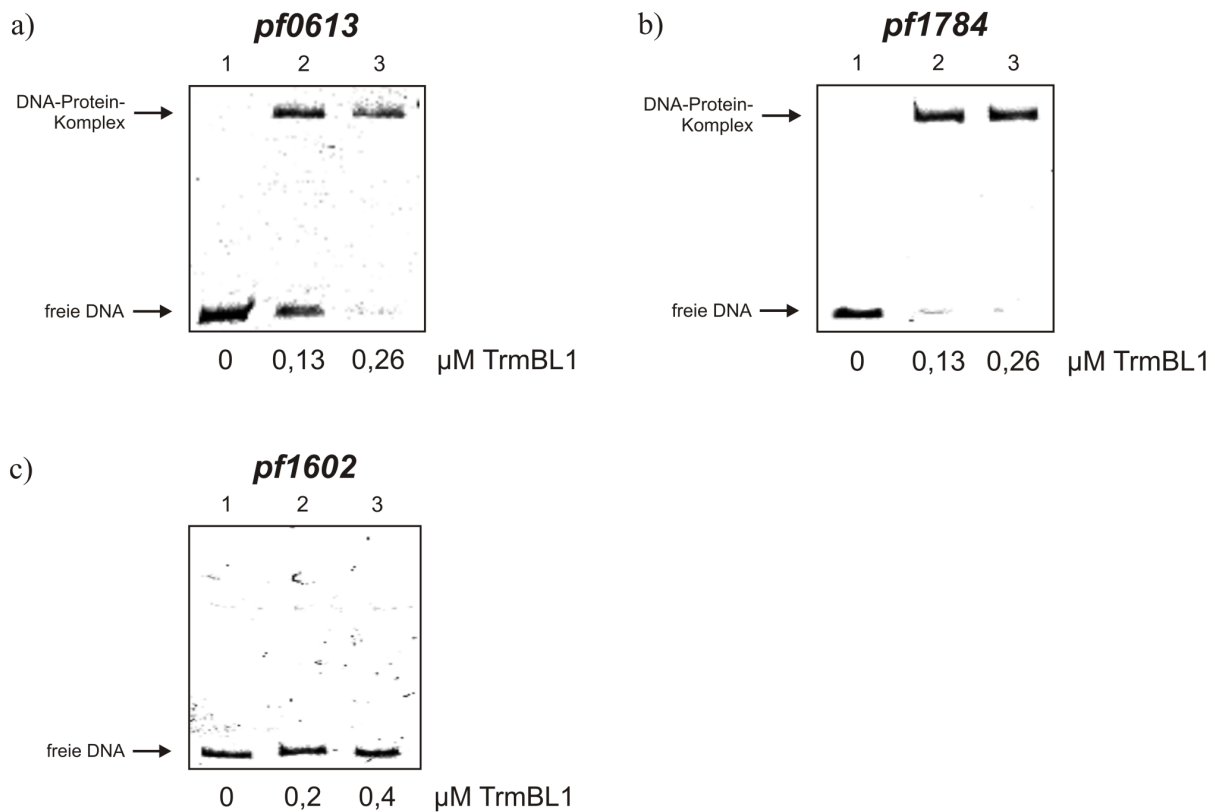


Abbildung III.7.: **Kontroll-EMSAs an bereits bekannten Promotoren.** Am FBPase (*pf0613*, a)- und PFK-Promotor (*pf1784*, b) kommt es durch die Bindung von TrmBL1 zu einem deutlich sichtbaren Shift der DNA. Eine Bindung von TrmBL1 an den GDH-Promotor (*pf1602*, c) findet jedoch nicht statt. Hier kommt es zu keinem Shift der DNA.

3.1.2. Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren

Zunächst sollte überprüft werden, ob TrmBL1 überhaupt in der Lage ist, an die neuen Promotoren zu binden. In den Abbildungen III.8 und III.9 sind alle durchgeführten EMSA-Experimente abgebildet. In den ersten Spuren ist jeweils die freie DNA zu sehen. Anschließend wurde TrmBL1 in Konzentrationen von $0,1$ - $0,5 \mu\text{M}$ zugegeben.

Am α -Glucosidase (*pf0132*)-, 4- α -Glucanotransferase (*pf0272*)- und am Pyrolysins-Promotor (*pf0287*) konnte mit $0,2 \mu\text{M}$ TrmBL1 bereits eine Bindung an die DNA erreicht werden (Abb. III.8, jeweils Spur 2). Eine Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ TrmBL1 führte jedoch nur am α -Glucosidase-Promotor zu einer vollständigen Bindung der DNA (Spur 3). Bei den anderen beiden Pro-

motoren lag ein erheblicher Anteil der DNA-Moleküle nach wie vor ungebunden vor. Bei der 4- α -Glucanotransferase war sogar nur die Hälfte an DNA von TrmBL1 gebunden (Spur 3). Ein Bildung von TrmBL1-DNA-Komplexen am Phosphoglucose-Isomerase-Promotor (*pf0196*) konnte mit nur 0,1 μ M TrmBL1 erreicht werden (Spur 2) und die im Ansatz vorhandene, gesamte DNA-Menge war bereits ab 0,2 μ M TrmBL1 gebunden (Spur 3). Die Promotoren der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*) und der Phosphoglycerat-Mutase (*pf0588*) zeigten beide eine Bindung an die Hälfte der vorhandenen DNA-Menge bei einer Konzentration von 0,25 μ M TrmBL1 im Ansatz (jeweils Spur 2). Eine Verdoppelung der TrmBL1-Menge auf 0,5 μ M sorgte jedoch nicht für eine Bindung der gesamten, vorliegenden DNA (jeweils Spur 3). Bei den Promotoren der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase Untereinheit δ (*pf0967*) und des hypothetischen Proteins *pf1085.1n* wurde ein Teil der DNA bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M TrmBL1 (jeweils Spur 2) gebunden. Nahezu die gesamte DNA war ab einer Konzentration von 0,2 μ M TrmBL1 am *pf0967*-Promotor bzw. 0,3 μ M TrmBL1 am *pf1085.1n*-Promotor gebunden (jeweils Spur 3).

Eine besondere Situation ergab sich bei einem EMSA-Experiment am PF1109-Promotor (Abb. III.9, *pf1109*). Hier wurde bei einer Konzentration von 0,25 μ M TrmBL1 ein kleiner Teil der DNA gebunden (Spur 2). Erhöhte man die TrmBL1-Konzentration auf 1,0 μ M wurde zwar immer noch nur ein kleiner Teil der DNA gebunden, aber oberhalb der Bande dieses Komplexes konnte noch ein zweiter DNA-Protein-Komplex identifiziert werden (Spur 3). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass TrmBL1 an diesem Promotor in einer anderen Konformation bindet. Im Laufe dieser Arbeit konnte dieses Phänomen jedoch nicht geklärt werden. Auch am PF1350-Promotor (siehe Abb. III.9, *pf1350*) konnte eine Bindung von TrmBL1 nachgewiesen werden. Diese war an diesem Promotor jedoch eher schlecht, da eine Konzentration von 0,5 μ M TrmBL1 gerade einmal ausreichte, um knapp die Hälfte der vorliegenden DNA zu binden und Protein-DNA-Komplexe zu bilden (Spur 3). Im Gegensatz dazu reichte eine Konzentration von 0,2 μ M TrmBL1 am PF1476- (*pf1476*), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*pf1874*)- und L-Asparaginase-Promotor (*pf2047*) aus, um nahezu die gesamte, vorliegende DNA zu binden und Protein-DNA-Komplexe zu bilden (siehe Abb. III.9, jeweils Spur 3).

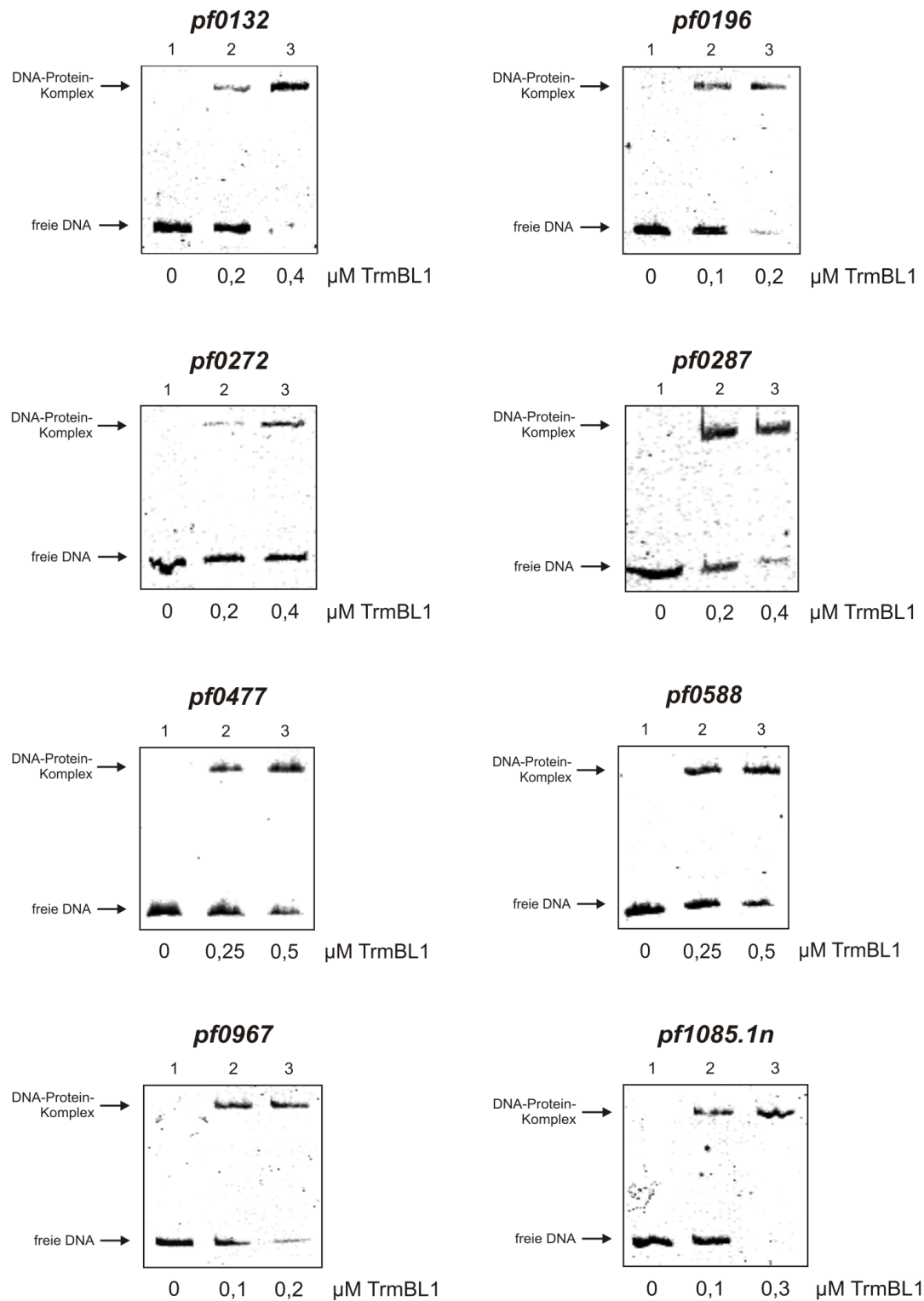


Abbildung III.8.: **Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren.** Die Zugabe von TrmBL1 in Konzentrationen von 0-0,5 μM führt bei allen getesteten DNA-Fragmenten zu einem Shift. Bei den Promotoren *pf0272*, *pf0477* und *pf0588* müssten jedoch noch höhere Konzentrationen an TrmBL1 eingesetzt werden, um die komplette DNA zu binden. Abkürzungen: *pf0132*, α -Glucosidase; *pf0196*, Phosphoglucose-Isomerase; *pf0272*, 4- α -Glucanotransferase; *pf0287*, Pyrolysin; *pf0477*, extrazelluläre α -Amylase; *pf0588*, Phosphoglucose-Mutase; *pf0967*, Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase UE δ ; *pf1085.1n*, hypothetisches Protein

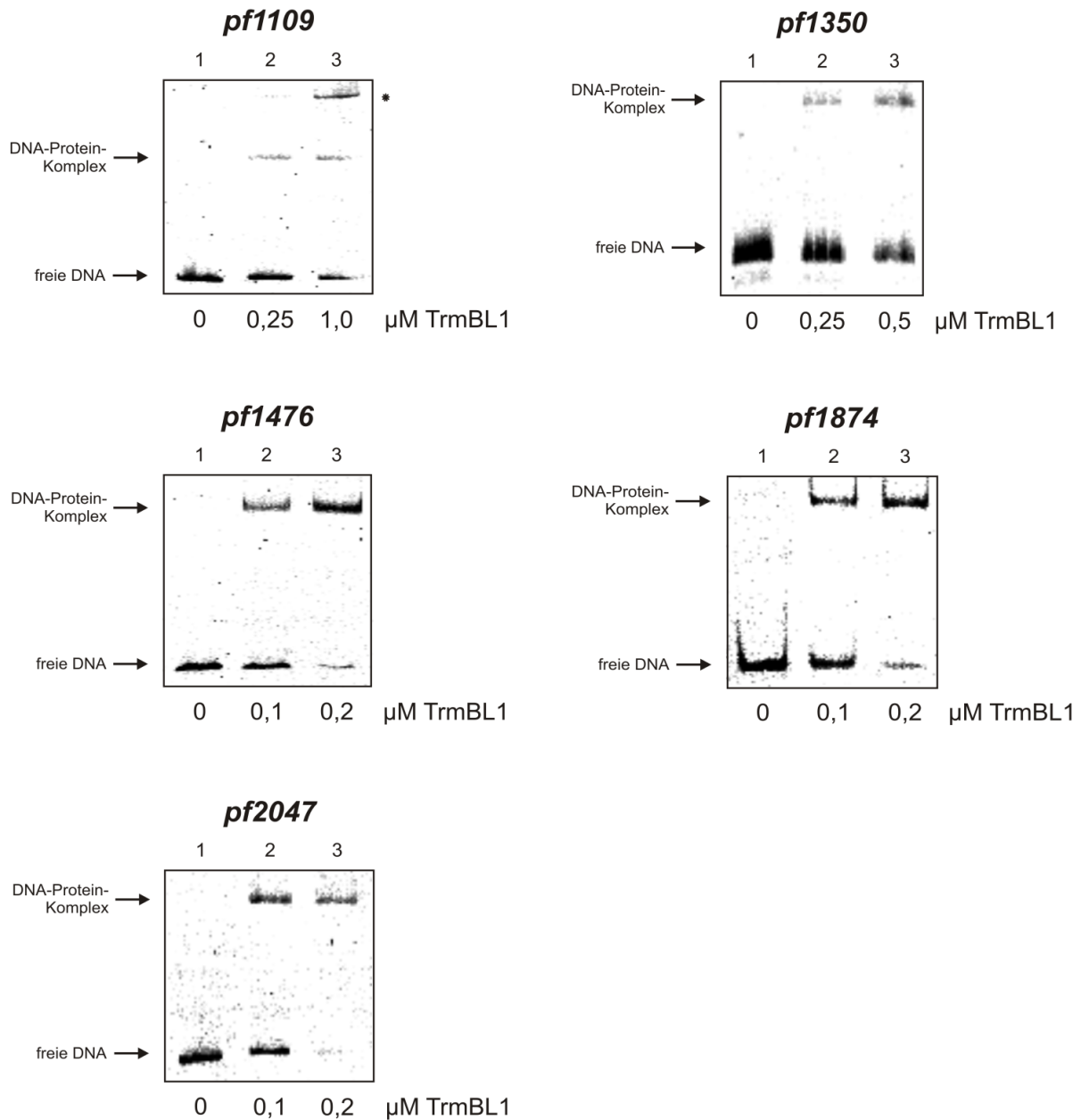


Abbildung III.9.: **Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren.** Auch hier führt die Zugabe von 0-1,0 μM TrmBL1 zu DNA-Protein-Komplexen von allen DNA-Fragmenten. Bei *pf1109* ist sogar noch ein weiterer Komplex oberhalb des normalen DNA-Protein-Komplexes erkennbar (*). Dieser könnte über die Bindung von TrmBL1 in einer weiteren Konformation entstanden sein. Die Bindung von TrmBL1 an das *pf1350*-DNA-Fragment ist eher gering und führt somit selbst bei 0,5 μM TrmBL1 nur zu einer geringen Bindung der vorhandenen DNA. Abkürzungen: *pf1109* und *pf1350*, hypothetische Proteine; *pf1476*, hypothetischer Transkriptionsregulator der PadR-Familie; *pf1874*, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; *pf2047*, L-Asparaginase

3.2. *In vitro* Transkriptionen mit TrmBL1 an den neu identifizierten Promotoren

3.2.1. Kontroll-Transkriptionen mit bereits bekannten Promotoren

Auch hier wurden zunächst Kontroll-Transkriptionen am GDH- (*pf1602*), am MD- (*pf1938*) und am PFK-Promotor (*pf1784*) durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit des neu gereinigten TrmBL1 zu überprüfen. Dabei sollte die Zugabe von TrmBL1 zum Ansatz mit dem GDH-Promotor keine Auswirkungen auf die Transkription zeigen, da dieser nicht von TrmBL1 reguliert wird. Bei den Promotoren der PFK und des MD-Operons hingegen war eine Repression der Transkription zu erwarten, da beide ein TGM vor der BRE/TATA-Box besitzen und bereits in einer früheren Arbeit gezeigt wurde, dass die Transkription an beiden Promotoren durch TrmBL1 reguliert wird [Surma, 2011].

In der Tat konnte am GDH-Promotor keine Repression der Transkription festgestellt werden (siehe Abb. III.10 a). Selbst bei einer Zugabe von 1,0 μM TrmBL1 (Spur 4) war keine Reduktion der Transkriptionsaktivität feststellbar. Die beiden anderen Promotoren jedoch wurden eindeutig von TrmBL1 reguliert. Beim PFK-Promotor (Abb. III.10 b, *pf1784*) begann eine Reduktion der Transkription bei 0,25 μM TrmBL1 (Spur 2), und eine Konzentration von 1,0 μM TrmBL1 führte letztendlich zur kompletten Repression der Transkription (Spur 4). Am MD-Promotor (Abb. III.10 c, *pf1938*) reichten sogar 0,25 μM TrmBL1 aus, um eine vollständige Repression der Transkription zu bewirken (Spur 2). Anhand dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass das neu gereinigte TrmBL1 einwandfrei funktioniert.

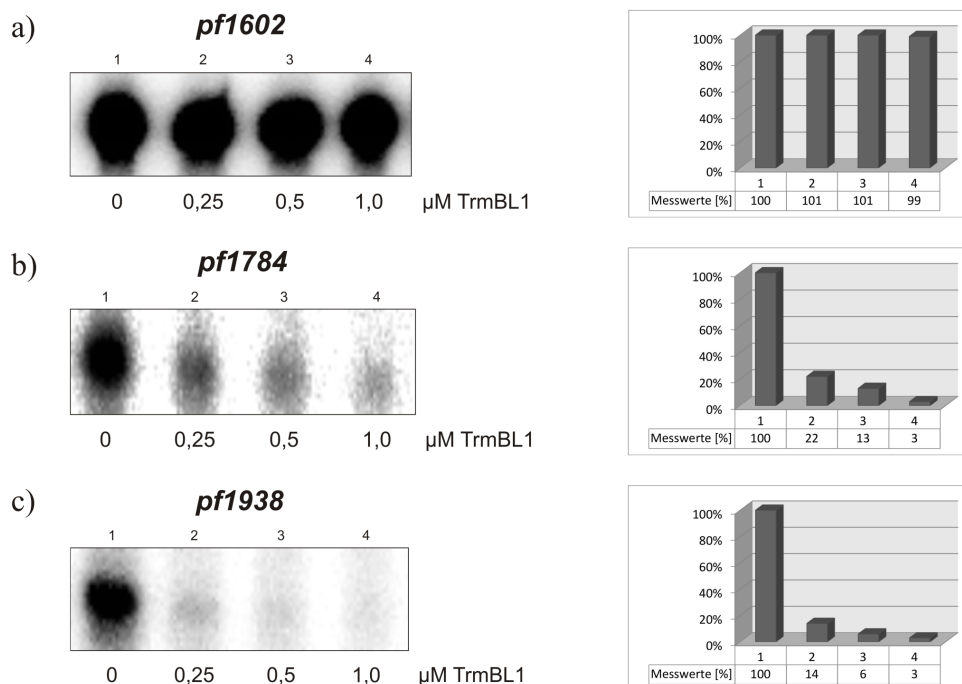


Abbildung III.10.: Kontroll-Transkriptionen mit dem GDH- (*pf1602*, a), dem PFK- (*pf1784*, b) und dem MD-Promotor (*pf1938*, c). Die Zugabe von 0-1,0 μM TrmBL1 führt nur am PFK- und am MD-Promotor (beide mit TGM) zur Repression der Transkription. Der GDH-Promotor (kein TGM) wird nicht von TrmBL1 reguliert. Die gemessenen Stärken der Transkriptionssignale sind in einem Balkendiagramm rechts neben den Transkriptionen angegeben. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von TrmBL1 entspricht immer 100 %.

3.2.2. Transkriptionen mit TrmBL1 an Promotoren mit TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box

Eine Repression der Transkription durch TrmBL1 an einigen Promotoren mit TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten bestätigt werden [Wang *et al.*, 2007, Surma, 2011]. Diese Ergebnisse waren auch die Grundlage für die Kontrolltranskriptionen im vorigen Kapitel (siehe 3.2.1). Im Laufe dieser Arbeit sollte nun an 11 neuen Promotoren getestet werden, ob TrmBL1 nicht nur in der Lage ist, an die Promotoren zu binden, sondern auch, ob eine Zugabe von TrmBL1 zu einer Repression der *in vitro* Transkription an diesen Promotoren führt. Eine Gemeinsamkeit aller hier getesteten Promotoren besteht darin, dass sie alle ein TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box besitzen. Eine Zugabe von TrmBL1 sollte daher an jedem Promotor zu einer Repression der Transkription führen.

An acht von elf Promotoren (*pf0043*, *pf0132*, *pf0196*, *pf0272*, *pf0477*, *pf0588*, *pf0967* und *pf1109*) reicht bereits eine TrmBL1-Konzentration von 0,25 μM aus, um eine nahezu vollständige Repression der Transkription zu erhalten (Abb. III.11 a-f und III.12 g und i, Spur 2). Am PF1350- und PF1476-Promotor hingegen waren 1,0 μM TrmBL1 notwendig, um eine 70%ige Repression der Transkription hervorzurufen (Abb. III.12 k und l, Spur 4). Eine Besonderheit stellte jedoch der PF1085.1n-Promotor dar. Bei diesem verminderte sich die Transkriptionsrate bei einer Zugabe von 0,25 μM TrmBL1 zwar um 70 % (Abb. III.12 h, Spur 2), eine Steigerung der TrmBL1-Konzentration auf bis zu 1,0 μM hatte jedoch keinen weiteren Effekt auf die Transkription (Spur 3-4). Eine Repression der Transkription konnte jedoch für alle gezeigten Promotoren eindeutig nachgewiesen werden.

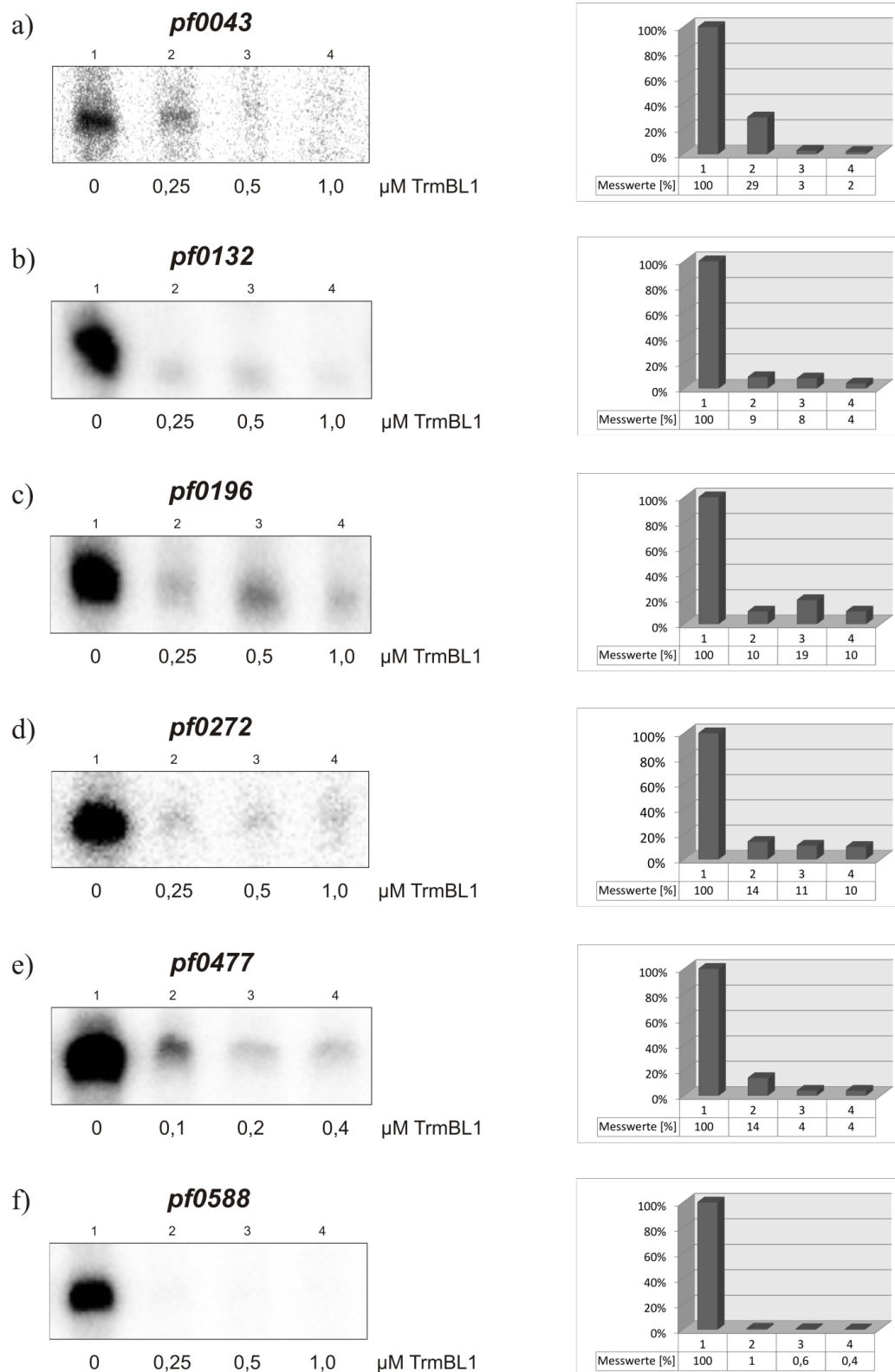


Abbildung III.11.: **Repression der Transkription an verschiedenen neuen Promotoren mit TGM nach der BRE/TATA-Box.** An allen Promotoren, außer dem Promotor der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*), wurde TrmBL1 in Konzentrationen von 0-1,0 μ M zugegeben und eine Verminderung der Transkriptionsaktivität um über 90 % erreicht. Bei *pf0477* reichten sogar schon 0,1 μ M TrmBL1 aus, um die Transkription auf 14 % zu senken. Rechts neben den Transkriptionen sind die jeweils gemessenen Transkriptionsaktivitäten als Balkendiagramme dargestellt. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von TrmBL1 entspricht immer 100 %.

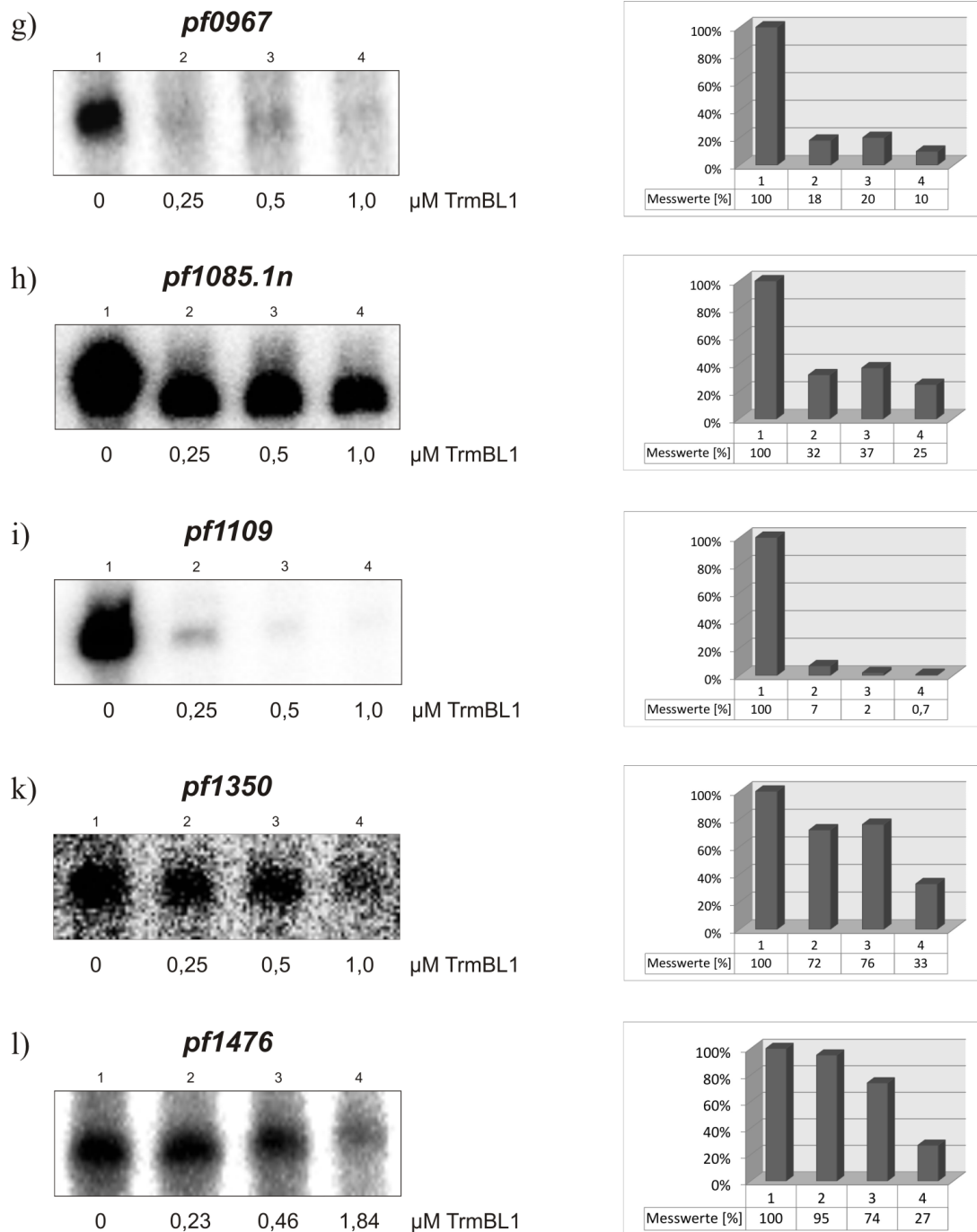


Abbildung III.12.: **Repression der Transkription an verschiedenen neuen Promotoren mit TGM nach der BRE/TATA-Box.** Bei diesen Ansätzen wurde TrmBL1 in Konzentrationen von 0-1,84 μ M zugegeben. Die gemessenen Verminderungen der Transkriptionsaktivitäten sind in Balkendiagrammen rechts neben den Transkriptionen dargestellt. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von TrmBL1 entspricht immer 100 %.

3.2.3. Transkriptionen mit TrmBL1 an Promotoren mit TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box

Eine Aktivierung der Transkription durch TrmBL1 konnte bereits am Promotor des gluconeogenetischen Enzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase, PF0613) gezeigt werden [Surma, 2011], an dem sich das TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box befindet. In ChIP-Seq-Experimenten von Robert Reichelt konnten nun vier neue Promotoren identifiziert werden, an denen das TGM ebenfalls stromaufwärts der BRE/TATA-Box liegt. Der erste Promotor exprimiert Pyrolysin (PF0287), ein Enzym des Aminosäuremetabolismus. Der zweite Promotor reguliert ein hypothetisches Protein (PF0648). Der dritte Promotor exprimiert das gluconeogenetische Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, PF1874), also ein wichtiges Enzym des Zuckerstoffwechsels von *P. furiosus*. Der vierte Promotor reguliert die L-Asparaginase (PF2047), ebenfalls ein Protein des Aminosäuremetabolismus. Eine Bindung von TrmBL1 an die Promotoren des Pyrolysin und der L-Asparaginase *in vitro* wäre letztendlich der Beweis dafür, dass TrmBL1 nicht nur im Zuckerstoffwechsel, sondern auch in anderen Metabolismen von *P. furiosus* eine regulierende Funktion besitzt und aktiv in den Stoffwechsel eingreift.

Bei näherer Betrachtung der Promotorsequenz von *pf0287* fiel eine TGM-Bindesequenz ins Auge, die sich stromaufwärts der BRE/TATA-Box befindet. Dies deutete auf eine Aktivierung der Transkription durch TrmBL1 hin. In EMSA-Experimenten konnte bereits eine Bindung von TrmBL1 an den Promotor nachgewiesen werden (siehe Abb. III.8, *pf0287*). Die *in vitro* Transkriptionen wurden nach dem Standardprotokoll mit Konzentrationen von 0-2,55 μM TrmBL1 durchgeführt. Eine Aktivierung der Transkription konnte an diesem Promotor jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abb. III.13, a). Auch der PF0648-Promotor besaß ein TGM stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Jedoch konnte auch hier keine Aktivierung der Transkription mit Konzentrationen von 0-1,0 μM TrmBL1 festgestellt werden (siehe Abb. III.13, b).

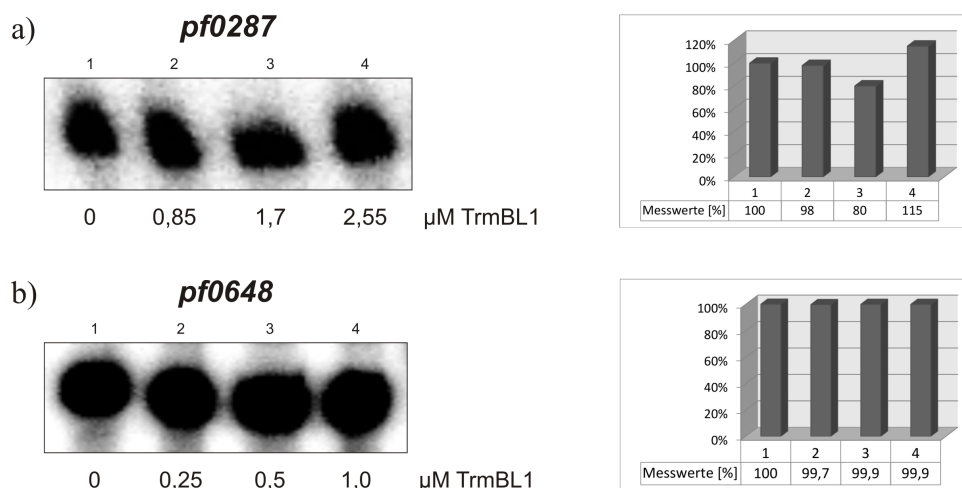


Abbildung III.13.: **Kein Einfluss von TrmBL1 auf die Transkription des Pyrolysin- (*pf0287*, a) und des *pf0648*-Promotors (b).** Auf der linken Seite sind die *in vitro* Transkriptionen zu den beiden Promotoren dargestellt. TrmBL1 wurde hier in Konzentrationen von 0-2,55 μM zugegeben. Rechts sind die gemessenen Transkriptionsaktivitäten in Balkendiagrammen dargestellt. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von TrmBL1 entspricht immer 100 %.

Die Transkriptionen der anderen beiden Promotoren wurden ebenfalls nach Standardprotokoll durchgeführt und TrmBL1 in Konzentrationen von 0-0,3 μM am GAPDH-Promotor und von 0-1,0 μM am L-Asparaginase-Promotor zugegeben. Am GAPDH-Promotor konnte eine Aktivierung der Transkription um 41 %, am L-Asparaginase-Promotor sogar um 70 % erreicht werden (siehe Abb. III.14). Die Aktivierung am GAPDH-Promotor untermauerte somit die Hypothese, dass TrmBL1 stark an der Regulation der Gluconeogenese beteiligt ist. Aber auch die Aktivierung am L-Asparaginase-Promotor zeigte, dass TrmBL1 auch in anderen Metabolismen als universeller Regulator eine Rolle spielt.

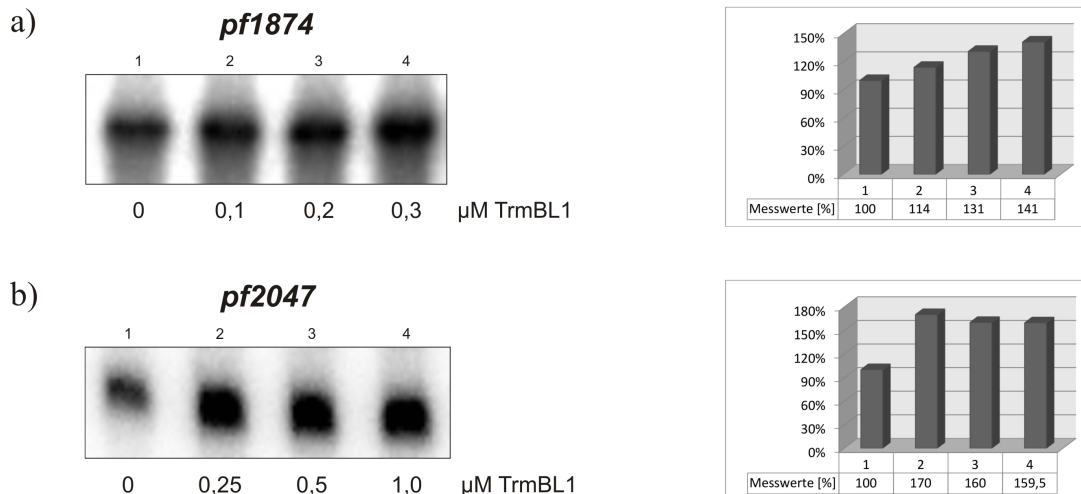


Abbildung III.14.: **Aktivierung der Transkription am GAPDH- (*pf1874*, a) und L-Asparaginase-Promotor (*pf2047*, b).** Auf der linken Seite sind die *in vitro* Transkriptionen zu den beiden Promotoren dargestellt. TrmBL1 wurde in Konzentrationen von 0-1,0 μM zugegeben. Rechts sind die gemessenen Transkriptionsaktivitäten als Balkendiagramme dargestellt. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von TrmBL1 entspricht immer 100 %.

Beim Einsatz von höheren TrmBL1-Konzentrationen kam es jedoch zu einer Repression des Signals am GAPDH- und L-Asparaginase-Promotor (Daten nicht gezeigt). Zudem war bei öfteren Wiederholungen der Versuche eine Aktivierung nicht immer zu sehen. Diese stellte sich als äußerst instabil heraus, ebenso wie die Aktivierung am FBPase-Promotor (*pf0613*). Es kam daher zu der Annahme, dass für eine Aktivierung an Promotoren mit TGM vor der BRE/TATA-Box weitere Transkriptionsfaktoren benötigt werden, um die Transkription dort zu stabilisieren. Dabei fiel das Hauptaugenmerk auf den Transkriptionsfaktor aMBF1, ein in Archaeen und Eukaryoten stark konserviertes Protein, welches in Eukaryoten als Brückenfaktor zwischen TBP und aktivierenden Transkriptionsfaktoren agiert, in Archaeen möglicherweise aber auch als selbstständiger Aktivator fungieren kann.

3.3. EMSAs mit aMBF1

Zunächst wurde überprüft, ob aMBF1 auch selbstständig in der Lage ist, an DNA zu binden. Dazu wurden EMSA-Versuche unter den gleichen Bedingungen wie mit TrmBL1 durchgeführt, in denen aMBF1 in Konzentrationen von 0-1,6 μM hinzugefügt wurde. Als Matrizen wurden die Promotoren der FBPase (*pf0613*), der GDH (*pf1602*) sowie der GAPDH (*pf1874*) verwendet. Wie in Abbildung III.15 zu sehen, ist aMBF1 an keinem der drei Promotoren in der Lage, selbstständig zu binden. Aufgrund der steigenden Menge an aMBF1 im Ansatz kam es lediglich zu einer Aggregation zwischen Protein und DNA, was in einem Verbleib in den Taschen resultierte. Ein eindeutiger DNA-Protein-Komplex war an keinem der getesteten Promotoren zu erkennen.

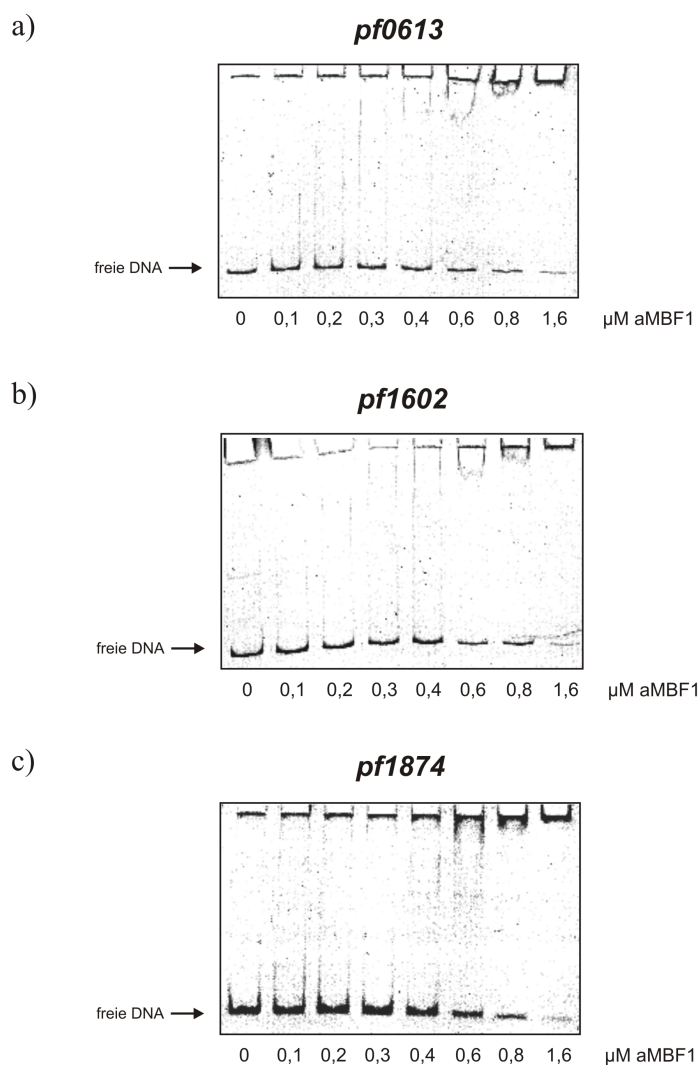


Abbildung III.15.: **EMSA mit aMBF1 an verschiedenen Promotoren.** Weder am FBPase- (a) noch am GDH- (b) oder GAPDH-Promotor (c) kommt es durch Zugabe von 0-1,6 μM TrmBL1 zu einem Shift der DNA. aMBF1 ist somit nicht in der Lage, eigenständig an die DNA zu binden.

Während ihrer Zulassungsarbeit wurden von Corinna Dechant auch EMSAs mit aMBF1 sowie TBP, TFB und RNAP durchgeführt. Auch hier konnte jedoch keine Wechselwirkung von aMBF1 mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

3.4. *In vitro* Transkriptionen mit aMBF1

Um zu überprüfen, ob der Transkriptionsfaktor aMBF1 Einfluss auf die Transkription im Allgemeinen sowie auf die Aktivierung der Transkription durch TrmBL1 im Besonderen besitzt, wurden *in vitro* Transkriptionen durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Matrizen getestet, um auch eine Abhängigkeit der Transkription von der Promotorregion bestimmen zu können. Für aMBF1 war bereits aus Versuchen in Eukaryoten bekannt, dass er eine wichtige Rolle als Brückenfaktor zwischen basaler Transkriptionsmaschinerie und weiteren Transkriptionsfaktoren einnimmt.

3.4.1. aMBF1 stimuliert die Transkription

Zunächst wurde getestet, ob aMBF1 selbst einen Einfluss auf die *in vitro* Transkription besitzt. Dazu wurden die gleichen Bedingungen wie bei der Transkription mit TrmBL1 verwendet und aMBF1 in steigenden Konzentrationen von 0-1,36 μM zugegeben. Als Matrizen dienten die Promotoren der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*), der GDH (*pf1602*), des TM-Operons (*pf1739*) und der GAPDH (*pf1874*). Diese Promotoren wurden ausgewählt, weil sie in den *in vitro* Transkriptionen mit TrmBL1 besonders gut transkribierten und entweder ein TGM stromauf- oder stromabwärts bzw. kein TGM besaßen.

Wie in Abbildung III.16 zu sehen, hat aMBF1 einen stimulierenden Effekt auf die Transkription aller getesteten Promotoren. Am Promotor der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*) stieg die Transkriptionsrate bei Zugabe von 0,17 μM aMBF1 zunächst um 54 % gegenüber der basalen Transkriptionsaktivität an (siehe Abb. III.16 a, Spur 2) und fiel dann mit zunehmender Konzentration an aMBF1 langsam auf 38 % über der basalen Transkriptionsaktivität ab (Spur 3-5). Am GDH-Promotor (*pf1602*, b) wurde eine Steigerung der Transkriptionsaktivität erst ab 0,34 μM aMBF1 erreicht (Spur 3). Diese wurde dafür jedoch um das 2,6-fache gegenüber der basalen Transkriptionsaktivität erhöht und stieg mit zunehmender Konzentration von aMBF1 sogar auf das 2,7-fache an (Spur 5). Am TM-Promotor (*pf1739*, c) setzte eine Steigerung der Transkriptionsaktivität sogar erst ab 0,68 μM aMBF1 ein (Spur 4) und konnte durch zunehmende Konzentration nur geringfügig bis auf 53 % über der basalen Transkriptionsaktivität gesteigert werden (Spur 5). Die Transkriptionsaktivität des GAPDH-Promotors (*pf1874*, d) verhielt sich ähnlich zum GDH-Promotor. Auch hier konnte eine Steigerung der Transkriptionsaktivität erst ab 0,34 μM aMBF1 um das 2,4-fache beobachtet werden (Spur 3), bevor diese mit zunehmender Konzentration an aMBF1 wieder auf 63 % über der basalen Transkriptionsaktivität abfiel (Spur 4-5).

Zudem wurde getestet, ob eine Verringerung der Transkriptionsfaktoren TBP bzw. TFB Auswirkungen auf die *in vitro* Transkriptionen mit aMBF1 zeigen. Auch der komplette Ersatz von TBP durch aMBF1 wurde getestet. Eine Verringerung der beiden Transkriptionsfaktoren TBP bzw. TFB führte nach wie vor zu einer Aktivierung der Transkription durch aMBF1, ein völliger Ersatz von TBP war jedoch nicht möglich. Ohne TBP konnte kein Transkriptionssignal mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

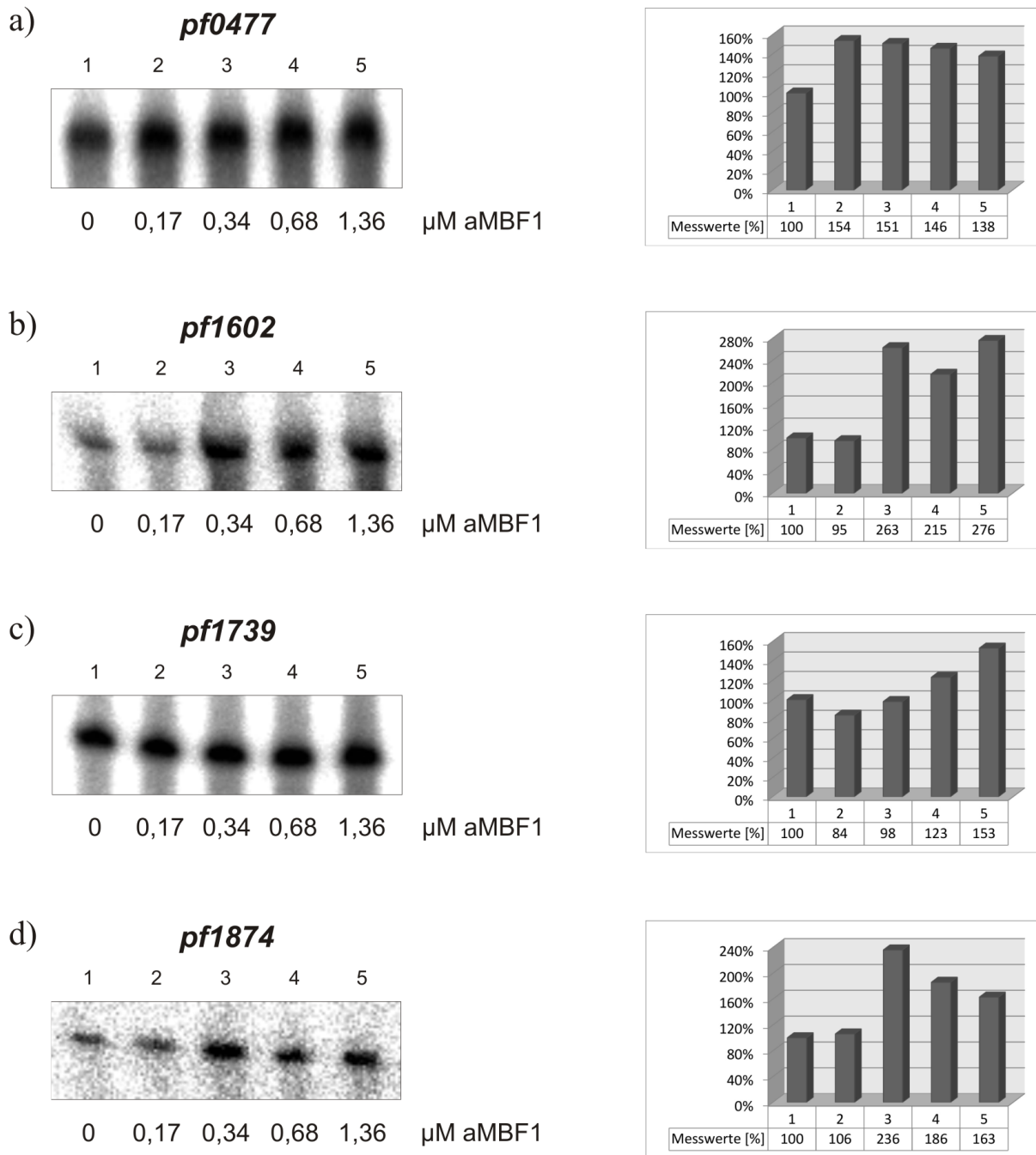


Abbildung III.16.: **In vitro** Transkriptionen mit aMBF1. Getestet wurde die *in vitro* Transkription am *pf0477* (a), am GDH- (*pf1602*, b), am TM- (*pf1739*, c) und am GAPDH-Promotor (*pf1874*, d). aMBF1 wurde dabei in steigenden Konzentrationen von 0-1,3 μM zugegeben. Rechts daneben sind die gemessenen Transkriptionsaktivitäten als Balkendiagramme dargestellt. Die basale Transkriptionsaktivität ohne Zugabe von aMBF1 entspricht immer 100 %.

3.4.2. aMBF1 hat keine aktivierende Wirkung auf die Transkription mit TrmBL1

Als nächstes sollte getestet werden, ob der Brückenfaktor aMBF1 einen Einfluss auf die Transkription mit TrmBL1 an Promotoren mit TGM vor bzw. nach der BRE/TATA-Box besitzt. Dazu wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem GAPDH- (TGM stromaufwärts, schwankende Aktivierung der *in vitro* Transkription durch TrmBL1) und dem Promotor des hypothetischen Proteins PF1109 (TGM stromabwärts, starke Repression der *in vitro* Transkription durch TrmBL1) durchgeführt, in denen 0,33 μM aMBF1 als zusätzlicher Transkriptionsfaktor im Ansatz vorhanden waren. Anschließend wurde wieder TrmBL1 in Konzentrationen von 0-1,36 μM hinzu titriert.

Wie in Abbildung III.17 zu sehen, veränderte die zusätzliche Anwesenheit von aMBF1 die Transkription mit TrmBL1 am GAPDH-Promotor (*pf1874*, a) nicht wesentlich. Die Transkriptionsaktivität stieg zwar zunächst um 24 % an (Spur 2), fiel dann aber auf das normale Transkriptionsniveau ohne TrmBL1 zurück (Spuren 3-5). Beim Ansatz mit DNA vom PF1109-Promotor, dessen TrmBL1-Bindestelle am Transkriptionsstart liegt, konnte zwar zunächst auch einen Anstieg der Transkription um ca. 20 % beobachten werden (Spuren 2+3), anschließend sank die Transkriptionsaktivität jedoch drastisch bis auf 36 % (Spuren 4+5) ab. Die normale Repressionsaktivität von TrmBL1 trat hier ab 0,68 μM TrmBL1 in Kraft, war jedoch nicht so stark wie ohne aMBF1 im Ansatz (vgl. III.12, i).

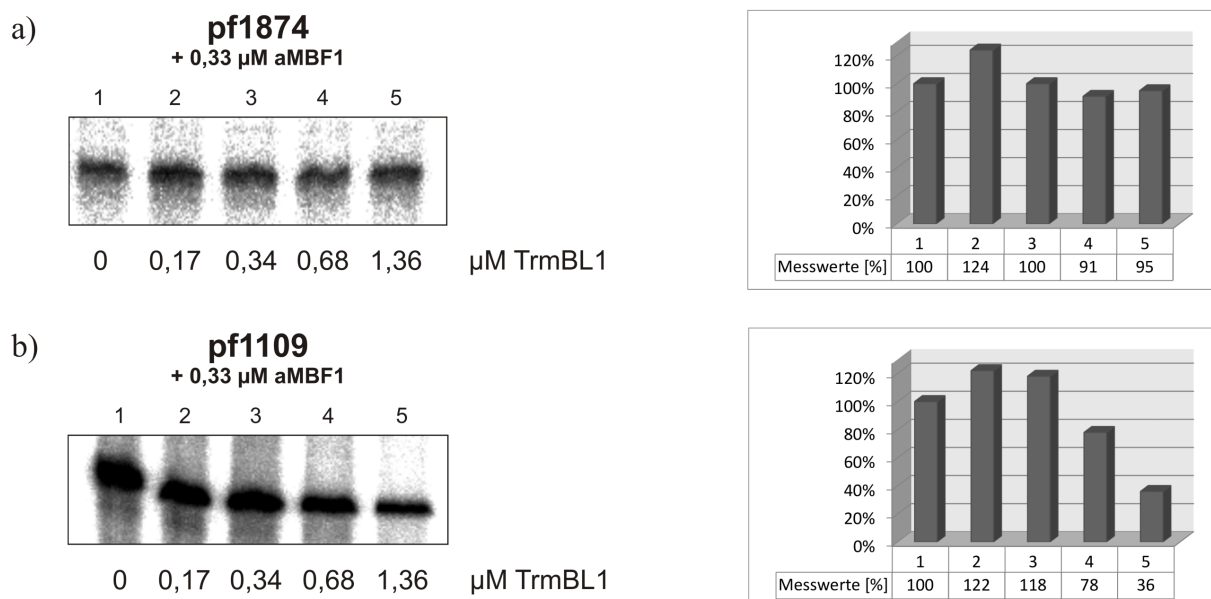


Abbildung III.17.: *In vitro* Transkriptionen mit aMBF1 und TrmBL1 am GAPDH- (*pf1874*, a) und *pf1109*-Promotor (b). aMBF1 wurde in diesen Transkriptionen mit einer stabilen Konzentration von 0,33 μM zugegeben. TrmBL1 wurde in steigenden Konzentrationen von 0-1,36 μM hinzugefügt. Rechts neben den Transkriptionen sind die Transkriptionsaktivitäten in einem Balkendiagramm dargestellt. Das basale Transkriptionsniveau mit aMBF1 und ohne TrmBL1 wird mit 100 % angegeben.

3.5. Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle durch DNaseI Footprints

Um die geeigneten Bedingungen für die DNaseI Footprints einstellen zu können, wurden zunächst Versuche am PFK-Promotor (*pf1784*) durchgeführt. An diesem konnte bereits in vorhergehenden Arbeiten eine spezifische Bindung von TrmBL1 nachgewiesen werden und dieser sollte hier deshalb als Kontrolle dienen. Auch in dieser Arbeit konnte eine Bindung von TrmBL1 an die Nukleotidsequenz 5'-CAGTTT**ATTGTG**ACTCCC**ACCATA**AGT-3', welche das TGM umschließt, bestätigt werden (siehe Abb. III.18, *pf1784*). Dabei zeigte sich, dass die besten Ergebnisse mit 0,0001 U DNaseI und einer Reaktionszeit von 5 Minuten erzielt wurden. Unter den selben Bedingungen sollte nun eine Bindung von TrmBL1 an sieben neue Promotoren nachgewiesen werden.

An fünf Promotoren, an denen TrmBL1 als Repressor der Transkription wirkte, konnte eine spezifische Bindung an die DNA gezeigt werden, wobei das TGM stets umschlossen wurde (siehe Abb. III.18). Am α -Glucosidase-Promotor (*pf0132*) band TrmBL1 an die Nukleotidsequenz 5'-CTGAT**ATTC**ACTTCT**GGTG**ATATAAGTG-3'. Diese beinhaltete den Transkriptionsstart sowie das TGM. An den Promotoren der 4- α -Glucanotransferase (*pf0272*) und der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*) band TrmBL1 hinter dem Transkriptionsstart. Das TGM umschloss jeweils das Translationsstartcodon. Bei *pf0272* wurde die Nukleotidsequenz 5'-TAAGGAAG**TATCA**CTCTTAG**TG**ATTAAATGG-3' gebunden, bei *pf0477* die Nukleotidsequenz 5'-ATATGT**ATCA**TAC**CA**GT**G**ATACATTATGAG-3'. Im Falle des hypothetischen Proteins PF1085.1n band TrmBL1 sogar hinter dem Translationsstart. Die dabei gebundene Nukleotidsequenz 5'-ATGG**TATCA**CTTCTAG**TG**GT**G**ATGGAAAT-3' umschloss ebenfalls das TGM. Beim *pf1476*-Promotor, der ebenfalls für ein hypothetisches Protein kodiert, lag die Bindesequenz hinter dem Transkriptionsstart, schloss aber den Translationsstart mit ein. Auch hier wurde das TGM von der Nukleotidsequenz 5'-GAATATAT**TTCA**T**CGA**AG**GTG**ATAAAA-ATGGA-3' umschlossen.

Auch die Bindestelle von TrmBL1 am GAPDH- (*pf1874*) und am L-Asparaginase-Promotor (*pf2047*) konnte mittels DNaseI Footprinting-Experimenten eindeutig ermittelt werden. Beide Promotoren wurden in den *in vitro* Transkriptionen durch TrmBL1 aktiviert. Bei genauerer Betrachtung der GAPDH-Promotorstruktur fiel auf, dass TrmBL1 an die Nukleotidsequenz 5'-TAAAT**AGTCA**CTTTG**AGTGA**AAACAAC-3' der DNA band und folglich das TGM umschloss (siehe Abb. III.19, *pf1874*). Das gleiche Resultat wurde am L-Asparaginase-Promotor erzielt. Dort band TrmBL1 an die Nukleotidsequenz 5'-GGTTAG**TG**TCCCTGAGGG**TGTTAA**ATGGGAAA-3', welche ebenfalls auf Höhe des TGM lag (siehe Abb. III.19, *pf2047*).

Abschließend lässt sich feststellen, dass TrmBL1 an allen acht getesteten Promotoren das TGM umschließt und dieses somit als äußerst wichtige Bindesequenz für TrmBL1-regulierte Gene gilt.

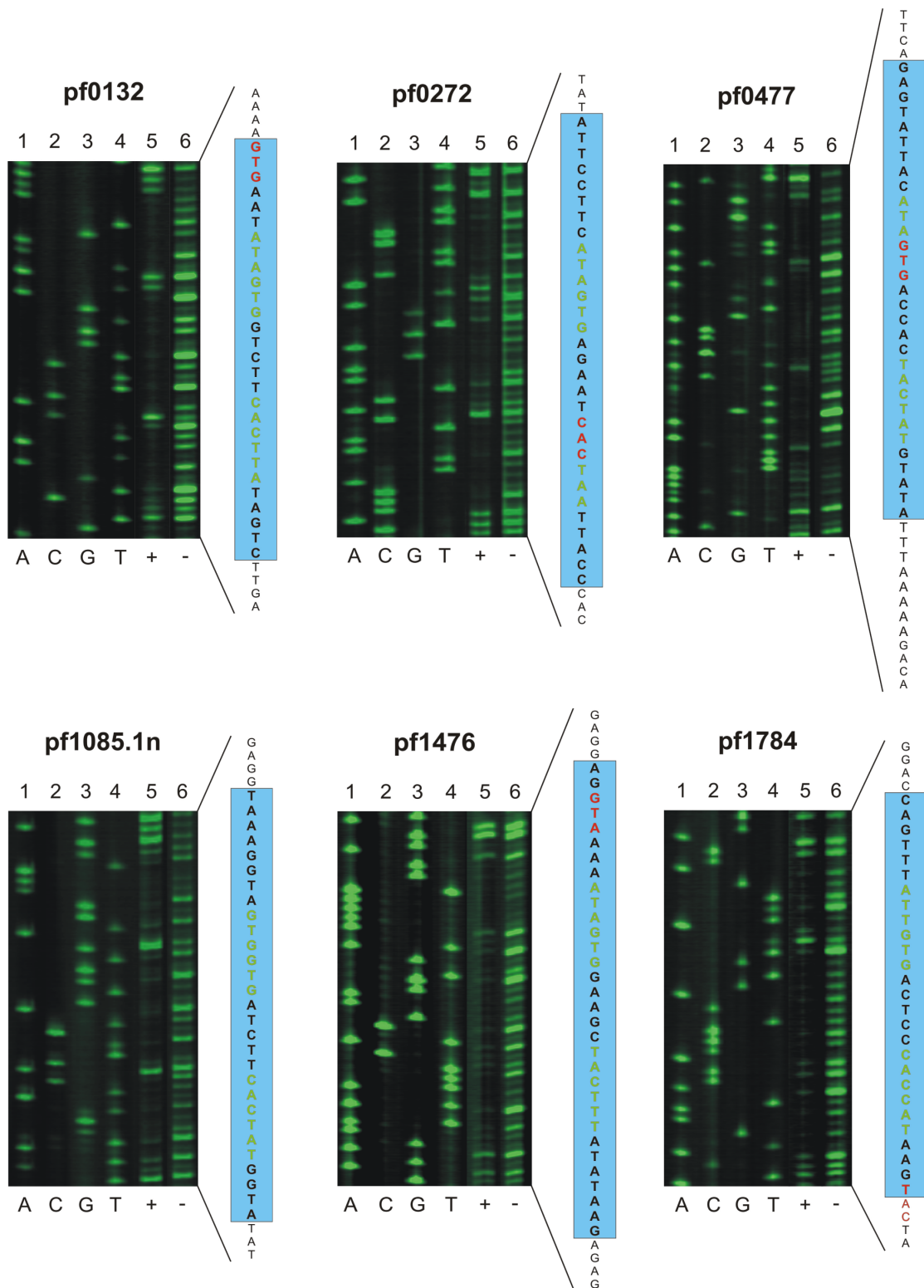


Abbildung III.18.: DNaseI Footprinting-Analysen der in *in vitro* Transkriptionen durch TrmBL1 reprimierten Promotoren. Der DNA-Standard (A, C, G, T) ist in den Spuren 1-4 wiedergegeben. Spur 5 zeigt den Footprint mit TrmBL1, Spur 6 die Kontrolle ohne Protein. Rechts daneben ist die zugehörige DNA-Sequenz abgebildet. Der Footprint ist blau umrandet. Das TGM ist in grünen Buchstaben, der Translationsstart (falls vorhanden) in roten Buchstaben dargestellt. Abkürzungen: *pf0132*, α -Glucosidase; *pf0272*, 4- α -Glucanotransferase; *pf0477*, extrazelluläre α -Amylase; *pf1085.1n*, hypothetisches Protein; *pf1476*, vermuteter Transkriptionsregulator der PadR-Familie; *pf1784*, Phosphofructokinase

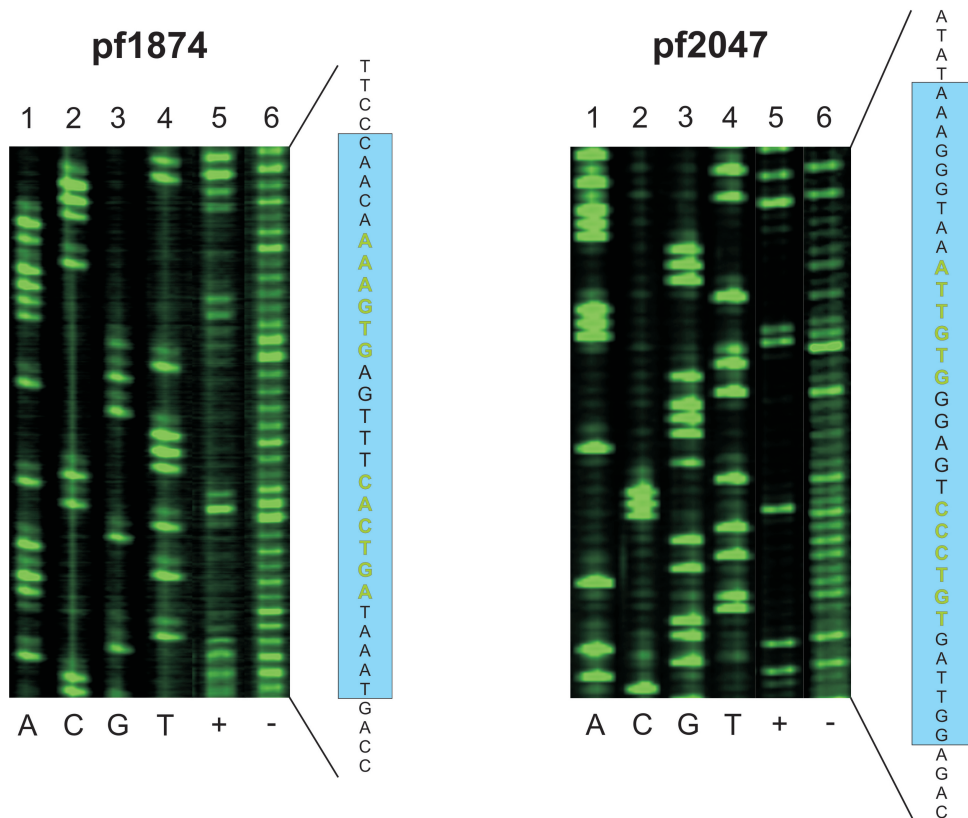


Abbildung III.19.: DNaseI Footprinting-Analysen des GAPDH- (*pf1874*) und L-Asparaginase (*pf2047*)-Promotors mit TrmBL1. Der DNA-Standard (A, C, G, T) ist in den Spuren 1-4 wiedergegeben. Spur 5 zeigt den Footprint mit TrmBL1, Spur 6 die Kontrolle ohne Protein. Rechts daneben ist die zugehörige DNA-Sequenz abgebildet. Der Footprint ist blau umrandet. Das TGM ist in grünen Buchstaben dargestellt.

3.6. Zusammenfassung aller Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente mit TrmBL1

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente mit TrmBL1 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

16 von 19 Promotoren wurden in EMSA-Experimenten von TrmBL1 gebunden und führten zu einer Bildung von DNA-Protein-Komplexen im Gel. Am GDH-Promotor (*pf1602*), der als Kontrolle dienen sollte, war demzufolge keine Bindung nachweisbar. Für die Promotoren der Phosphoenolpyruvat-Synthase (*pf0043*) und des hypothetischen Proteins PF0648 wurden keine EMSAs durchgeführt, und es ließ sich somit keine Aussage über deren Bindefähigkeit bezüglich TrmBL1 treffen.

Mittels *in vitro* Transkription wurde die Regulation durch TrmBL1 an 18 Promotoren getestet. Der GDH-Promotor (*pf1602*) diente auch hier als Kontrolle und seine Transkription wurde nicht durch die Zugabe von TrmBL1 beeinflusst. Auch an den beiden Promotoren für Pyrolysin (*pf0287*) und des hypothetischen Proteins PF0648 konnte kein Effekt beobachtet werden. Die restlichen Promotoren wurden entsprechend der Lage des TGM in ihrer Promotorregion reguliert. Bei der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*pf1874*) und der L-Asparaginase (*pf2047*) lag das TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box und es kam infolge dessen zu einer Aktivierung der Transkription. Diese Aktivierung war jedoch sehr instabil, deshalb wurde getestet, ob ein weiterer Transkriptionsfaktor namens aMBF1 möglicherweise an der Aktivierung beteiligt ist und diese stabilisieren kann. Die restlichen Promotoren besaßen ein TGM, welches stromabwärts der BRE/TATA-Box situiert war. An ihnen kam es durch die Bindung von TrmBL1 zu einer Repression der Transkription.

Erste EMSAs mit aMBF1 an verschiedenen Promotoren lieferten keine Hinweise darauf, dass der Faktor an sich an die DNA binden kann. *In vitro* Transkriptionen mit steigenden Mengen an aMBF1 führten jedoch zu einem Anstieg der Transkriptionsaktivität an allen getesteten Promotoren. Bei *in vitro* Transkriptionen mit aMBF1 und gleichzeitiger Anwesenheit von TrmBL1 konnte am *pf1874*-Promotor (TGM vor der BRE/TATA-Box) gezeigt werden, dass zwar die Transkriptionsaktivität zunächst leicht ansteigt, sich anschließend jedoch auf die normale Transkriptionsaktivität einpendelt. Am PF1109-Promotor, der das TGM am Transkriptionsstart besitzt, konnte zunächst dieselbe Steigerung der Transkriptionsaktivität beobachtet werden. Mit steigenden Mengen an TrmBL1 folgte jedoch eine Repression der Transkription.

Für die DNaseI Footprinting-Versuche wurden nur acht Promotoren ausgewählt. An drei Promotoren wurden bereits Footprints mit TrmBL1 nachgewiesen (*pf0272*, *pf1784* und *pf1938*), die restlichen fünf Promotoren hingegen waren komplett unbekannt. Ein Footprint durch TrmBL1 auf Höhe des TGM konnte jedoch an allen acht Promotoren nachgewiesen werden.

Als Endergebnis aller *in vitro* Versuche lässt sich feststellen, dass für eine Promotorbindung von TrmBL1 in allen Fällen ein TGM vorhanden sein muss. Eine kurze Übersicht aller Ergebnisse ist in Abb. III.20 wiedergegeben.

Gen	Genname	TGM	EMSA	<i>in vitro</i> Transkription	DNaseI Footprint
pf0043	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	downstream		Repression	
pf0132	α -Glucosidase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0196	Phosphoglucose-Isomerase	downstream	Ja	Repression	
pf0272	4- α -Glucanotransferase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0287	Pyrolysin	upstream	Ja	kein Effekt	
pf0477	extrazelluläre α -Amylase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0588	Phosphoglucose-Mutase	downstream	Ja	Repression	
pf0613	Fructose-1,6-Bisphosphatase	upstream	Ja		
pf0648	Hypothetisches Protein	upstream		kein Effekt	
pf0967	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase UE δ	downstream	Ja	Repression	
pf1085.1n	Hypothetisches Protein	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1109	Hypothetisches Protein, Stärke-bindend	downstream	Ja	Repression	
pf1350	Hypothetisches Protein, möglicher Transporter	downstream	Ja	Repression	
pf1476	vermuteter Transkriptionsregulator, PadR-Familie	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1602	Glutamat-Dehydrogenase	Nein	Nein	kein Effekt	
pf1784	Phosphofruktokinase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1874	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	upstream	Ja	Aktivierung	Ja
pf1938	Maltodextrin-Bindeprotein (MD-System, <i>malE</i>)	downstream	Ja	Repression	
pf2047	L-Asparaginase	upstream	Ja	Aktivierung	Ja

Abbildung III.20.: **Erzielte Ergebnisse aller in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche mit TrmBL1.** Grün hinterlegte Gene waren bereits bekannt, bei den gelb hinterlegten Genen wurde eine Regulation durch TrmBL1 vermutet und die blau hinterlegten Gene wurden in ChIP-Seq-Versuchen von Robert Reichelt neu entdeckt.

IV. Diskussion

1. TrmB und TrmBL1 besitzen keine multiplen DNA-Bindehelices in ihrer DNA-Bindedomäne

Aufgrund von Mutationsanalysen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TrmB seine Zielpromotoren mit unterschiedlichen Helices in seiner N-terminalen DNA-Bindedomäne erkennt. Es fallen zwei potentielle HTH-Strukturen auf (siehe Abb. III.1), welche für eine unterschiedliche DNA-Bindung verantwortlich sein könnten. Untersuchungen in Form von EMSAs und *in vitro* Transkriptionen mit TrmB-Punktmutanten am TM- und MD-Promotor bestätigten diese Theorie [Surma, 2011]. Vor allem die Punktmutation an Position 50 (TrmB Y50N) in HTH-1 hatte am TM-Promotor entscheidende Konsequenzen. Durch diese Mutation ging die Bindungsfähigkeit an den TM-Promotor fast vollständig verloren, wohingegen die Bindung an den MD-Promotor nicht beeinträchtigt wurde. Eine Punktmutation an Position 87 (TrmB E87A) in HTH-2 hingegen verursachte einen Verlust der Bindung von TrmB an den MD-Promotor. Die Bindungsfähigkeit an den TM-Promotor wurde jedoch nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen für eine Bindung von TrmB an den TM-Promotor via HTH-1, wohingegen der MD-Promotor mit HTH-2 gebunden wird.

Auch bei TrmBL1 wurden Bindungsstudien mit Punktmutanten der beiden Helices durchgeführt, jedoch nicht am TM- und MD- sondern am PFK- und TrmBL1-Promotor [Surma, 2011]. Der Unterschied dieser beiden Promotoren besteht im Vorhandensein des TGM. Der PFK-Promotor besitzt ein konserviertes TGM stromabwärts der BRE/TATA-Box, der TrmBL1-Promotor enthält jedoch kein TGM. In diversen *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von TrmBL1 mit der Punktmutation D50N an Promotoren mit TGM nicht mehr möglich war, die Bindung an Promotoren ohne TGM jedoch nicht beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu führte die Punktmutation E81A zur Aufhebung der Bindung an TGM-lose Promotoren, wohingegen Promotoren mit TGM nach wie vor erkannt wurden. Daraus wurde geschlossen, dass eine Bindung von TrmBL1 an Promotoren mit TGM via HTH-1 erfolgt, an Promotoren ohne TGM via HTH-2.

Betrachtet man die N-terminale DNA-Bindedomäne – welche beide Helices enthält – von TrmB und TrmBL1 etwas genauer (siehe Abb. IV.1), lässt sich eine fast 40%ige Ähnlichkeit der beiden Proteine in dieser Region feststellen. Da beide Proteine laut früheren *in vitro* Versuchen zwei DNA-Bindehelices für die Regulation verschiedener Promotoren verwenden und TrmBL1 auch an der Regulation des TM- (kein TGM) und MD-Promotors (mit TGM) beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob ein kompletter Austausch der beiden Helices zu einer veränderten Regulation der beiden Promotoren führt. Am TM-Promotor sollte TrmB mit HTH-1 von TrmBL1 also eine langsam abnehmende Transkriptionsaktivität bei steigender Proteinkonzentra-

tion bewirken – ähnlich zum TrmBL1-Wildtyp-Protein – wohingegen TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB eine komplette Repression der Transkription bereits bei geringen Proteinkonzentrationen ergeben sollte – ähnlich zum TrmB-Wildtyp-Protein. Am MD-Promotor hingegen sollten genau umgekehrte Verhältnisse vorliegen. TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB sollte sich ähnlich zum TrmB-Wildtyp-Protein verhalten, also eine langsam abnehmende Transkriptionsaktivität bei steigender Proteinkonzentration bewirken, wohingegen TrmB mit HTH-1 von TrmBL1 eine komplette Repression der Transkription bereits bei geringen Proteinkonzentrationen ergeben sollte – ähnlich zum TrmBL1-Wildtyp-Protein.

```

TrmB      MEIPPEISHALSEIGFTKYEILTYWLLVYGPSTAKEISTKSGIPYNRVYDTISSLKLRG
TrmBL1    -MLEEEILQKLQKFGITKYESLAYLTLKLGPSTKATDVTKESGIPHTRIYDVLSSLARKG
           :  **  :  *.:*:***** *: *  ***  ***.*.:...:*****.:*:*.:***  : *

TrmB      FVTEIEGTPKVYAAYSPIAFFRFKKELEDIMKKLEIELN-
TrmBL1    FVDIVHGTPLRYAPVNPEIVLEKIREDLISDIERLKKAFQE
           **   :.***:.*  .*.*. : :.:.*  . :.:* : :

```

Abbildung IV.1.: **Alignment der Aminosäuresequenzen der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB und TrmBL1.** Stark konservierte Aminosäuren sind mit einem Sternchen gekennzeichnet, ähnliche mit einem Punkt oder Doppelpunkt.

Am TM-Promotor konnten diese Hypothesen bestätigt werden: *In vitro* Transkriptionen mit TrmBL1, das die erste Bindehelix von TrmB besitzt, zeigten, dass eine komplette Repression der Transkription, ähnlich der Repression durch das TrmB-Wildtyp-Protein, eintritt; der gleiche Helixtausch in TrmB führte – wie vermutet – zu einer langsamen Abnahme der Transkriptionsaktivität bei steigender Proteinkonzentration, entsprechend dem TrmBL1-Wildtyp-Protein. *In vitro* Transkriptionen am MD-Promotor lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse: Die Transkriptionen mit TrmB, welches das HTH-1 von TrmBL1 besaß, führten nicht – wie erwartet – bereits bei niedriger Proteinkonzentration ($0,5 \mu\text{M}$) zu einer kompletten Repression der Transkription (ähnlich zu TrmBL1-Wildtyp-Protein), sondern nur zu einer langsam abnehmenden Transkriptionsaktivität (jedoch erst ab einer Proteinkonzentration von $1,5 \mu\text{M}$). Die andere Helixmutante (TrmBL1 mit HTH-1 von TrmB) sollte laut Theorie eine langsam abnehmenden Transkriptionsaktivität mit steigender Proteinkonzentration besitzen – ähnlich zum TrmB-Wildtyp-Protein. *In vitro* Transkriptionen mit dieser Helixmutante führten aber bereits ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ zu einer kontinuierlich stärkeren Abnahme der Transkriptionsaktivität als mit TrmB-Wildtyp-Protein. Aufgrund dieser Ergebnisse und auch weil neuere *in vitro* Transkriptionen mit neu aufgereinigten TrmB- und TrmBL1-Punktmutanten andere Ergebnisse als in den davor durchgeführten Experimenten ergaben, wurde die Hypothese der beiden Bindehelices verworfen.

Laut neuen Strukturdaten zu TrmB in Komplex mit Sucrose wäre die hier als HTH-1 bezeichnete Bindehelix tatsächlich für die Bindung von TrmB an DNA verantwortlich [Krug *et al.*, 2013]. Genau über diese Helix $\alpha 4$ und deren Gegenstück $\alpha 4'$ im Dimer würde TrmB an zwei aufeinander folgende, große Furchen in der B-DNA binden. Das gängige Bindungsmuster von Proteinen auf der gleichen Seite der DNA ist durch die Orientierung der beiden $\alpha 4$ -Helices jedoch nicht

wahrscheinlich. Eine Konformationsänderung bei Bindung an den TM-Promotor wird nicht ausgeschlossen, jedoch scheinen vor allem das Tyrosin an Position 50 und in weniger bedeutendem Maße das Aspartat an Position 51 eine Rolle zu spielen. Ob für eine Bindung von TrmB an das halbe Palindrom des MD-Promotors ebenfalls eine Konformationsänderung verantwortlich ist, konnte bisher nicht geklärt werden, da noch kein Kristall mit gebundener DNA erzeugt werden konnte. Die als HTH-2 bezeichnete Bindehelix ist in der $\alpha 5$ -Helix von TrmB zu finden. Diese ist jedoch nicht für die DNA-Bindung zuständig, sondern bildet laut neueren Strukturdaten einen coiled-coil Komplex über den TrmB die Dimerbildung induziert. Die Dimerbildung erfolgt dabei über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen zwei benachbarten CC-Helices. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Aminosäurepaare Phe81/Ile91', Phe84/Leu88', Leu88/Phe84' und Ile91/Phe81'. Mutationen in dieser Helix könnten demnach dazu führen, dass die Dimerisierung von TrmB blockiert und somit auch eine Bindung an die DNA verhindert wird. Andererseits könnten die Mutationen auch dazu führen, dass eine Monomerisierung von TrmB nicht mehr möglich ist und dieses nur als Dimer vorliegt. Eine Aufhebung der Repression durch die jeweilige TrmB-Mutante aufgrund vereitelter Monomer- oder Dimerbildung könnte demzufolge ebenfalls für die Ergebnisse der *in vitro* Transkriptionen verantwortlich sein. Dies ließe sich möglicherweise anhand von EMSAs klären, jedoch bereiteten bereits die Shiftexperimente mit Wildtyp-Proteinen erhebliche Probleme an beiden Promotoren.

2. Wachstum von *Pyrococcus furiosus* Wildtyp sowie der *TrmBL1*-Deletionsmutante

Die Mikroskopie der Zellen des Wildtyps im Vergleich zu denen der Deletionsmutante zeigte, dass die Zellen der Mutante kleiner waren als die des Wildtyps. In den Wachstumsanalysen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. Die Deletionsmutante wuchs zwar im Vergleich zum Wildtyp etwas langsamer, aber erreichte trotzdem annähernd gleiche Zellzahlen. In den ChIP-Seq-Versuchen von Robert Reichelt wurde später festgestellt, dass im hier als *P. furiosus* Wildtyp verwendeten Stamm eine Deletion der Gene *pf1737* bis *pf1751* vorlag. Es wurde vermutet, dass die in Regensburg verwendeten Kultivierungsbedingungen (1/2 SME + 0,1 % Stärke + 0,1 % Hefeextrakt + 0,1 % Pepton) eine Deletion dieses Fragmentes begünstigen. Eine neu bestellte Kultur des Typstammes DSM3638 der DSMZ, welcher mit 0,5 % Pepton und 0,1 % Hefeextrakt kultiviert wurde, zeigte diese Deletion nicht (Dissertation Robert Reichelt). Für die Erstellung des Wildtyp-Stammes mit Simvastatinresistenz sowie der *TrmBL1*-Mutanten bedeutet die Deletion, dass in allen das Gen für TrmB (*pf1743*) fehlt. Somit wäre auch der als „Wildtyp“ bezeichnete Stamm eine Deletionsmutante, nämlich $\Delta trmB$. Bei der $\Delta trmBL1$ -Mutante ist deshalb davon auszugehen, dass diese als TrmB/TrmBL1-Doppeldeletionsmutante vorliegt. Ein Nachweis darüber wurde bisher noch nicht durchgeführt. Die Doppeldeletion könnte jedoch eine Erklärung dafür sein, warum die Zellen kleiner sind als die des „Wildtyps“. Zwar kann in Abhängigkeit von der Mutation auch bei Einfach-Mutanten die Größe der Zellen variieren, da jedoch kein tatsächlicher Wildtypstamm am Lehrstuhl vorlag, ist ein Vergleich der Zellgröße zum richtigen Wildtyp nicht möglich. Zudem könnte durch diese Deletionen die Regulation der Metabolismen von *P. furiosus* an mehreren Stellen erheblich gestört sein und es deshalb zu einem kleineren Zellwachstum

kommen. Da die Stämme auf einem Vollmedium mit genügend Stärke, Hefeextrakt und Pepton gezogen wurden, konnte womöglich ein fortwährendes Wachstum gewährleistet werden, weil genügend Substrate vorhanden waren. Eine Umstellung auf Medium, welches ein „glycolytisches“ (1/2 SME + 0,1 % Stärke + 0,025 % Hefeextrakt) oder „gluconeogenetisches“ (1/2 SME + 40 mM Pyruvat + 0,025 % Hefeextrakt) Wachstum fördert, könnte genauere Erkenntnisse darüber bringen, ob das Wachstum der Deletionsstämmen unter diesen Bedingungen größeren Störungen wie beispielsweise verzögertem Wachstum, geringerer maximaler Zellzahlen oder sogar Lethalität unterworfen ist. Ein völliger Verzicht auf Hefeextrakt ist dabei jedoch nicht möglich, da *P. furiosus* nur in Anwesenheit von Hefeextrakt wachsen kann, selbst wenn die Konzentration sehr gering ist. Genauere Untersuchungen zu glycolytischem oder gluconeogenetischem Wachstum konnten in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen jedoch nicht mehr durchgeführt werden, da die Stämme bei direkter Überimpfung nicht wachsen können und erst langsam an die neue Medienzusammensetzung gewöhnt werden müssen. Dies wären aber interessante Ansätze für fortführende Versuche. Zudem könnte sowohl die $\Delta trmB$ -Mutante als auch die $\Delta trmB/trmBL1$ -Doppelmutante für Microarray Versuche verwendet werden, um einen noch detaillierteren Überblick über das regulatorische Netzwerk der beiden Transkriptionsregulatoren zu bekommen.

3. Neue TrmBL1-regulierte Gene

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass TrmBL1 an die sechs bereits vermuteten Promotoren sowie die sieben völlig neuen, unbekannten Promotoren binden kann. Betrachtet man diese genauer, kann man in jeder Promotorsequenz ein TGM finden. Am α -Glucosidase-Promotor (*pf0132*) beginnt die Bildung von Protein-DNA-Komplexen in EMSAs ab einer Konzentration von 0,2 μ M, und 0,4 μ M TrmBL1 reichen aus, um die gesamte DNA zu binden. In den *in vitro* Transkriptionen erreichte man eine nahezu vollständige Repression der Transkriptionsaktivität bereits ab einer Konzentration von 0,25 μ M TrmBL1. Durch DNaseI Footprints konnte schließlich die genaue Bindestelle von TrmBL1 bestimmt werden. Diese umschließt das TGM, welches sich kurz oberhalb des Translationsstarts befindet. Am Phosphoglucose-Isomerase-Promotor (*pf0196*) konnte eine ähnliche Situation gezeigt werden. An diesem reicht bereits eine Konzentration von 0,2 μ M TrmBL1 aus, um die gesamte DNA zu binden, und auch die *in vitro* Transkriptionen zeigten, dass bei dieser TrmBL1-Konzentration eine 90%ige Repression eintritt. An diesem Promotor wurde zwar kein DNaseI Footprint durchgeführt, jedoch befindet sich auch hier das TGM kurz vor dem Translationsstart, was auf eine Bindung von TrmBL1 in diesem Bereich hindeutet.

Eine völlig andere Situation ergab sich am Pyrolysin-Promotor (*pf0287*). Dieses Protein ist eine mit der Zellmembran assoziiertes Protease mit hoher Thermoaktivität und -stabilität [Eggen *et al.*, 1990, Voorhorst *et al.*, 1996]. Betrachtet man dessen Promotorsequenz genauer, erkennt man, dass sich ca. 100 bp vor dem Translationsstart ein mögliches TGM befindet. Da ein genauer Transkriptionsstart sowie das dazugehörige BRE und die TATA-Box nicht bekannt sind, lässt sich nicht genau sagen, ob an dieser Stelle eine Aktivierung oder doch eine Repression der Transkription stattfinden sollte. Es wurde jedoch von einer Aktivierung der Transkription durch TrmBL1 ausgegangen, da das TGM so weit vor dem Translationsstart zu finden ist und ein Signal

in den ChIP-Seq-Versuchen von Robert Reichelt nur unter gluconeogenetischen Bedingungen gefunden werden konnte (vgl. PF0613-Promotor). Obwohl in den EMSA-Versuchen ab einer Konzentration von 0,4 μM TrmBL1 die gesamte DNA geshiftet wurde und demnach TrmBL1 sehr gut binden kann, konnte in den *in vitro* Transkriptionen selbst eine Steigerung der Konzentration von 0,85 auf 2,55 μM nicht zu einer Aktivierung führen. Zudem ist ausgeschlossen, dass TrmBL1 das davor liegende Gen *pf0286*, welches für ein hypothetisches Protein codiert, reguliert, da dieses die gleiche Transkriptionsrichtung wie Pyrolysin besitzt. Möglicherweise würden suboptimale Transkriptionsbedingungen zu einem besseren Effekt führen, da die basale Transkriptionsaktivität bereits sehr hoch ist. Nachdem jedoch auch Wiederholungen der ChIP-Seq-Versuche von Robert Reichelt keine Signale an diesem Promotor mehr lieferten (möglicherweise lag eine Falschbindung vor), ist davon auszugehen, dass es sich hier um ein TGM-ähnliches Motiv handelt, das möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt der Evolution aktiv an der Regulation beteiligt war, nun jedoch an dieser Stelle keine Funktion mehr besitzt.

Am Promotor der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*) konnte man eine eher schlechte Bindung beobachten, da selbst eine Konzentration von 0,5 μM TrmBL1 nicht ausreichte, um die DNA komplett zu binden. In den *in vitro* Transkriptionen hingegen reichten bereits 0,1 μM TrmBL1 aus, um eine 85%ige Repression hervorzurufen. In den DNaseI Footprints konnte hier ebenfalls eine Bindung von TrmBL1 auf Höhe des TGM, welches den Translationsstart umschließt, gezeigt werden. Eine ganz ähnliche Situation ergab sich am Phosphoglycerat-Mutase-Promotor (*pf0588*). Auch dort war ein eher schlechter Shift zu beobachten, bei dem eine Konzentration von 0,5 μM TrmBL1 gerade einmal ausreichte, um an 70 % der vorhandenen DNA zu binden. Bei den *in vitro* Transkriptionen hingegen reichten 0,25 μM TrmBL1 aus, um die Transkription vollkommen zu unterbinden. Auch an diesem Promotor liegt das TGM direkt vor dem Translationsstart. Auf einen direkten Nachweis über die Bindung von TrmBL1 an dieser Stelle via DNaseI Footprints wurde verzichtet, da dieselbe Situation am PF0477-Promotor vorliegt und dort bereits genauer untersucht wurde. Eine mögliche Erklärung für die schlechten EMSA-Ergebnisse wäre, dass die gebildeten DNA-Protein-Komplexe einfach zu schwach ausgeprägt waren und deshalb kein Shift zustande kam. Eine Optimierung der EMSA-Bedingungen würde an diesen Promotoren möglicherweise zu einem besseren Resultat führen.

In den ersten ChIP-Seq-Versuchen von Robert Reichelt band TrmBL1 auch am Promotor des hypothetischen Proteins PF0648. Betrachtet man auch hier die Promotorsequenz genauer, findet man ein TGM ca. 220 bp stromaufwärts des Translationsstarts, das jedoch nur eine geringe Konservierung zur Konsensussequenz aufweist. Es wurden deshalb erste Vermutungen aufgestellt, ob dieser Promotor durch TrmBL1 reguliert wird. Da es sich in einer früheren Arbeit von Frau Dr. Melanie Surma gezeigt hat [Surma, 2011], dass ein TGM vor der BRE/TATA-Box zu einer Aktivierung der Transkriptionsaktivität an diesem Promotor führt, sollte dies auch am PF0648-Promotor via *in vitro* Transkription überprüft werden. Nach ersten Versuchen, in denen die Konzentration an TrmBL1 bis auf 1,0 μM gesteigert wurde, konnte jedoch kein Effekt auf die Transkriptionsaktivität des Promotors beobachtet werden. Möglicherweise würden suboptimale Transkriptionsbedingungen zu einem besseren Effekt führen, da auch hier – genau wie am Pyrolysin-Promotor – die basale Transkriptionsaktivität sehr hoch ist. Zudem kann-

ten nachfolgende ChIP-Seq-Versuche eine Bindung an diesen Promotor nicht mehr bestätigen. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass es sich bei dem ersten erhaltenen ChIP-Seq-Signal ebenfalls um eine Falschbindung handelte. Weitere Versuche an diesem Promotor wurden nicht durchgeführt.

Am Promotor der δ -Untereinheit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (*pf0967*) konnte eine vollständiger Bindung der vorliegenden DNA mit 0,2 μ M TrmBL1 erreicht und auch eine Repression der Transkription um 80 % bei ungefähr gleicher Konzentration gezeigt werden. Da auch hier das TGM direkt vor dem Translationsstart situiert ist, ist davon auszugehen, dass TrmBL1 auch an diesem Promotor genau an dieser Stelle bindet (vgl. PF0477-Promotor). Es wurde deshalb auf weiterführende DNaseI Footprinting Versuche verzichtet. Zudem handelt es sich hier um ein polycistronisches Operon, das von *pf0971* bis *pf0965* transkribiert wird. Während die Gene *pf0971* bis *pf0968* für die Untereinheiten der Pyruvat/Ketoisovalerat-Ferredoxin-Oxidoreduktase kodieren, welche beim Abbau der Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin tätig ist, sind die Gene *pf0967* bis *pf0965* für die Transkription der Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zuständig [Kletzin und Adams, 1996]. Diese ist im Pyruvat-Metabolismus für die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA nötig. Eine Regulation an dieser Stelle des Operons zieht somit automatisch eine Regulation des Pyruvatmetabolismus nach sich. Ein ähnliches Szenario wurde bereits für *H. NRC1* beschrieben [Koide *et al.*, 2009].

Der Promotor des hypothetischen Proteins PF1085.1n ist der einzige, an dem das TGM hinter dem Translationsstart liegt. Es sollte daher durch TrmBL1 zu einer Repression der Transkription kommen. In den DNaseI Footprinting-Versuchen wurde eine Bindung von TrmBL1 genau auf Höhe des TGM nachgewiesen. Auch EMSA-Versuche konnten zeigen, dass eine Konzentration von 0,3 μ M TrmBL1 ausreicht, um die gesamte freie DNA zu binden und diese zu shiften. Die *in vitro* Transkriptionen führten jedoch zu keinem so eindeutigen Ergebnis. Zwar reduzierte sich die Transkriptionsaktivität durch Zugabe von 0,25 μ M TrmBL1 auf nur noch 30 %, eine weitere Reduktion durch steigende Mengen an TrmBL1 konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Transkriptionsaktivität pendelte sich auch bei einer Konzentration von 1,0 μ M TrmBL1 bei 25-30 % ein. Vermutlich genügt eine Reduktion der Transkriptionsaktivität dieses Promotors für dessen Regulation bereits, ohne dass eine komplette Abschaltung nötig ist.

Eine weitere Besonderheit stellt der Promotor des hypothetischen Proteins PF1109 dar. Dort liegt ein sehr gut konserviertes TGM kurz vor dem Translationsstart. Erste *in vitro* Transkriptionen führten bereits ab einer Konzentration von 0,25 μ M TrmBL1 zu einer nahezu vollständigen Repression. EMSA-Versuche zeigten jedoch, dass TrmBL1 in derselben Konzentration wie in den *in vitro* Transkriptionen nur sehr vereinzelt an die DNA bindet und zu einem Shift führt. Eine Steigerung der TrmBL1-Konzentration auf 1,0 μ M führte jedoch nicht zu einer Zunahme des Signals auf dieser Höhe, sondern verursachte eine weitere Bande oberhalb des ersten Shifts. Auch die Signalstärke dieser Bande war wesentlich stärker als die der Komplexe darunter, jedoch lag noch fast 50 % der DNA ungebunden vor. Die zweite, obere Bande könnte ein Hinweis darauf sein, dass TrmBL1 an diesem Promotor in höheren Konzentrationen mit einer anderen Konformation bindet. Dieses Phänomen konnte jedoch noch nicht nachgewiesen und auch an

keinem anderen getesteten Promotor beobachtet werden. Eine zweite Bindestelle von TrmBL1 an diesem Promotor ist eher unwahrscheinlich und konnte auch in den ChIP-Seq-Versuchen nicht nachgewiesen werden.

Auch die Promotorregion von PF1350 – einem putativen, membranständigen Transportprotein der Major-Facilitator-Superfamilie – wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Dissertation Robert Reichelt) durch TrmBL1 reguliert. Hier handelt es sich ebenfalls um einen neuen durch TrmBL1 regulierten Promotor. Bei näherer Betrachtung der Promotorsequenz findet man ein eher schwach konserviertes TGM vor dem Translationsstart, was auf eine Repression der Transkription durch TrmBL1 hindeutet. In den EMSAs konnten 0,5 μM TrmBL1 nur ca. 30 % der freien DNA binden und auch in den *in vitro* Transkriptionen führte diese Konzentration an TrmBL1 nur zu einer 24%igen Reduktion der Transkriptionsaktivität. Erst ab einer Konzentration von 1,0 μM TrmBL1 konnte eine Repression der Transkription um ca. 70 % erreicht werden. Hier könnte man vermuten, dass das schwach ausgeprägte TGM für die eher mäßige Bindung von TrmBL1 an diesem Promotor verantwortlich ist. Da diese Schlussfolgerung jedoch nicht an allen Promotoren getroffen werden konnte, bleibt es auch hier unklar, ob die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des TGM einen Einfluss auf die Bindung von TrmBL1 hat.

Ein weiterer Höhepunkt in der Liste der neuen durch TrmBL1-regulierten Promotoren ist das Gen *pf1476*, das für einen putativen Transkriptionsregulator der PadR-Familie codiert. In *T. kodakarensis* konnte bereits eine Repression dieses Gens durch Tgr – einem homologen Protein zu TrmBL1 – nachgewiesen werden [Kanai *et al.*, 2007]. ChIP-Seq-Versuche von Robert Reichelt konnten zeigen, dass dieses Gen falsch annotiert ist. Der vermeintliche Translationsstart befindet sich 153 bp stromaufwärts des zur Zeit annotierten Startpunktes. Kurz davor befindet sich auch an diesem Promotor ein eher schwach ausgeprägtes TGM, auf dessen Höhe TrmBL1 in den hier durchgeführten DNaseI Footprints bindet. EMSA-Versuche führten bereits bei einer Konzentration von 0,2 μM TrmBL1 zu einem nahezu vollständigen Shift der vorhandenen DNA, was eine relativ gute Bindung von TrmBL1 an den Promotor zeigt. In den *in vitro* Transkriptionen mussten jedoch 1,84 μM TrmBL1 eingesetzt werden, um eine 70%ige Repression der Transkription zu erreichen. Die Regulation dieses Promotors zeigt somit, dass TrmBL1 in der Lage ist, die Expression von Transkriptionsregulatoren anderer Metabolismen, deren Promotoren kein TGM besitzen, zu beeinflussen und dadurch indirekt als globaler Regulator zu wirken. Ein ähnlicher Mechanismus ist bereits für das TrmB-Ortholog VNG1451C aus *Halobacterium salinarum* beschrieben worden, der stromaufwärts von fünf Transkriptionsfaktoren binden kann, sein eigener Promotor bereits inbegriffen [Schmid *et al.*, 2009]. Ansonsten kontrolliert VNG1451C in Abwesenheit von Glucose oder Glycerol annähernd 113 Promotoren. Diese gehören zu verschiedenen Metabolismen, wie beispielsweise den zentralen Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismen mit ihren dazugehörigen Cofaktoren und Vitaminen sowie die Purinbiosynthese. Kommt es zu Veränderungen in der Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen, werden auch enzymkodierende Gene reguliert. Zudem fungiert VNG1451C als bifunktionaler Regulator, der sowohl in der Regulation des Redox- sowie des Energiehaushalts der Zelle bei verändertem Nahrungsangebot involviert ist.

Die Promotoren, welche sich in dieser Arbeit jedoch als am interessantesten herausstellten, waren der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*pf1874*)- und der L-Asparaginase-Promotor (*pf2047*). Die GAPDH ist ein wichtiges Enzym der Gluconeogenese, das die Umsetzung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat vorantreibt [Matsubara *et al.*, 2011], wohingegen die L-Asparaginase im Alanin-, Aspartat- und Glutamatmetabolismus situiert ist und dort die Umsetzung von L-Asparagin in L-Aspartat und Ammoniak katalysiert [Bansal *et al.*, 2010]. Hierbei handelt es sich also um ein völlig neues Wirkungsfeld von TrmBL1, den Aminosäuremetabolismus. Erste Hinweise auf eine Regulation durch TrmBL1 an beiden Promotoren wurden bereits von Gerrit Schut und Kollegen durch Microarray Analysen gezeigt [Schut *et al.*, 2003]. Beide Promotoren besitzen ein TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box. Bei der GAPDH liegt es in nächster Nachbarschaft dazu, bei der L-Asparaginase hingegen ist es mehr als 50 bp entfernt. DNaseI Footprinting-Versuche konnten in beiden Fällen eine Bindung von TrmBL1 auf Höhe des TGM nachweisen, und auch in den EMSA-Versuchen konnte eine nahezu vollständige Bindung der vorhandenen DNA bei einer Konzentration von 0,2 μ M TrmBL1 erreicht werden. Die Durchführung der *in vitro* Transkriptionen gestalteten sich dagegen schwieriger. Bei beiden konnte zwar eine Steigerung der Transkriptionsaktivität um 40 bzw. 70 % erreicht werden, jedoch meist nur bei geringeren Konzentrationen an TrmBL1. Auch spielten verringerte Konzentrationen an TBP und TFB eine Rolle bei der Aktivierung (Daten nicht gezeigt), welche sich jedoch nach wie vor sehr instabil verhielt. Diese Beobachtung wurde bereits am FBPase-Promotor gemacht [Surma, 2011]. Zudem ist unklar, wie genau es am L-Asparaginase-Promotor bei dieser großen Entfernung zur BRE/TATA-Box zu einer Aktivierung des Promotors kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass die DNA durch die Bindung von TrmBL1 eine Art Schleife bildet und somit eine Wechselwirkung mit zusätzlichen oder den basalen Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird. Ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus wurde bereits für die Proteine Ptr2 aus *Methanococcus jannaschii* [Ouhammouch *et al.*, 2003], das mit TBP interagiert, und TFB-RF1 (PF1088) aus *P. furiosus* [Ochs *et al.*, 2012], welches mit TFB wechselwirkt, beschrieben.

In ersten Versuchen in Eukaryoten mit zusätzlichen Transkriptionsfaktoren wurde der Multiprotein Bridging Factor MBF1 entdeckt, der durch Wechselwirkung mit Aktivator und TBP zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität führte [Li *et al.*, 1994]. Da es sich bei diesem Faktor um ein stark konserviertes Protein sowohl in Eukaryoten als auch in Archaeen handelt [de Koning *et al.*, 2009, Marrero Coto, 2010], wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dieser Faktor ebenfalls an einer Aktivierung der Transkription in *P. furiosus* beteiligt ist. Zunächst wurde überprüft, ob aMBF1 alleine in der Lage ist, an DNA zu binden bzw. Einfluss auf die Transkriptionsaktivität besitzt. In EMSA-Versuchen stellte sich heraus, dass es aMBF1 zwar nicht möglich ist, alleine an DNA zu binden, jedoch konnte eine Steigerung der Transkriptionseffektivität durch aMBF1 bei *in vitro* Transkriptionen an verschiedenen Promotoren um das bis zu 2,7-fache der basalen Transkriptionsaktivität erreicht werden. Versuche mit konstanter Konzentration an aMBF1 und gleichzeitiger Steigerung der TrmBL1-Konzentration führten jedoch wiederum nur bei geringen Konzentrationen an TrmBL1 zu einer Aktivierung der Transkription. Am GAPDH-Promotor pendelte sich die Transkriptionsaktivität anschließend bei ca. 95 % ein, wohingegen sie am PF1109-Promotor zu einer Reduktion auf bis zu 36 % führte. Eine Wechselwirkung von aMBF1 mit TrmBL1 um die Transkription zu aktivieren und/oder zu stabilisieren, konnte nicht nachgewiesen werden.

Da eine hohe Konservierung dieses Proteins – ähnlich zu TBP und TFB – vorliegt, wurde zudem darüber spekuliert, ob aMBF1 möglicherweise TBP als generellen Transkriptionsfaktor ersetzen könnte. Dies konnte jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionen nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch neuere EMSA-Experimente von Corinna Dechant mit aMBF1, TBP, TFB und RNAP konnten keine Wechselwirkungen zwischen den Faktoren zeigen. Wie genau die in dieser Arbeit gefundene Aktivierung der Transkription durch aMBF1 zustande kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Zudem müssten noch mehr Versuche durchgeführt werden, um die genaue Funktion von aMBF1 im Metabolismus von *P. furiosus* zu erörtern. Bisher ist noch nicht einmal bekannt, an welcher Stelle bzw. wie aMBF1 den Metabolismus beeinflusst und reguliert. Neuere Untersuchungen zu aMBF1 in *Sulfolobus solfataricus* enthüllten, dass das Protein über seine N-terminale HTH-Domäne mit der 30S-Untereinheit von Ribosomen interagiert und somit eher eine Rolle bei der Translation spielt [Fabian *et al.*, 2014]. In dieser Studie wird auch berichtet, dass die Expression von aMBF1 in *E. coli* zu einem durchweg gekürzten Produkt führt. Möglicherweise trifft dies auch für das hier benutzte aMBF1 aus *P. furiosus* zu. Das Protein wurde nur auf einem SDS-Gel untersucht, jedoch nicht via tryptischem Verdau und Massenspektrometrie. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein eine andere Struktur besitzt und dadurch die hier erzielten Ergebnisse erheblich beeinflusst wurden.

Letztendlich konnte im Laufe dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass TrmBL1 nicht nur an der Regulation des Zuckerstoffwechsels sondern auch in anderen Metabolismen eine wichtige Rolle spielt. Neue regulierte Promotoren in Metabolismen wie dem Dextrinstoffwechsel, dem Aminosäuremetabolismus sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren konnten dies bestätigen. In Abb. IV.2 ist eine kurze Übersicht gezeigt, von welchen Metabolismen bereits bekannt ist, dass sie durch TrmBL1 reguliert werden.

Als Fazit dieser Arbeit kann genannt werden, dass TrmBL1 an die getesteten Promotoren, die alle ein TGM enthalten, bindet. In *in vitro* Transkriptionen kam es zu einer mehr oder weniger starken Repression der Transkription, wenn das TGM kurz vor, am oder kurz hinter dem Transkriptionsstart lag. Eine generelle Aussage darüber, ob die Stärke der Repression mit der Ähnlichkeit zur Konsensussequenz des TGM zusammenhängt, kann jedoch nicht getroffen werden. Zu diesem Schluss gelangte auch Robert Reichelt durch seine durchgeführten ChIP-Seq Versuche. Es konnte zudem nicht geklärt werden, wie genau der Aktivierungsmechanismus an den Promotoren mit TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box funktioniert. Es wird immer noch davon ausgegangen, dass ein weiterer Transkriptionsfaktor an der Aktivierung beteiligt ist und als Vermittler zwischen TrmBL1 und der basalen Transkriptionsmaschinerie fungiert. Mit Sicherheit lässt sich aber sagen, dass das TGM eine sehr wichtige Rolle für die Bindung von TrmBL1 an die regulierten Promotoren spielt. In Abb. IV.3 ist nochmals in einer Tabelle zusammengefasst, welche Promotoren, die durch TrmBL1 reguliert werden, bereits bekannt sind und durch welche *in vitro* Versuche dies nachgewiesen wurde. Einige der aufgelisteten Promotoren wurden bereits in früheren Arbeiten untersucht [Surma, 2011, Wang *et al.*, 2007, Van De Werken *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2007a, Lee *et al.*, 2008], andere in dieser Arbeit.

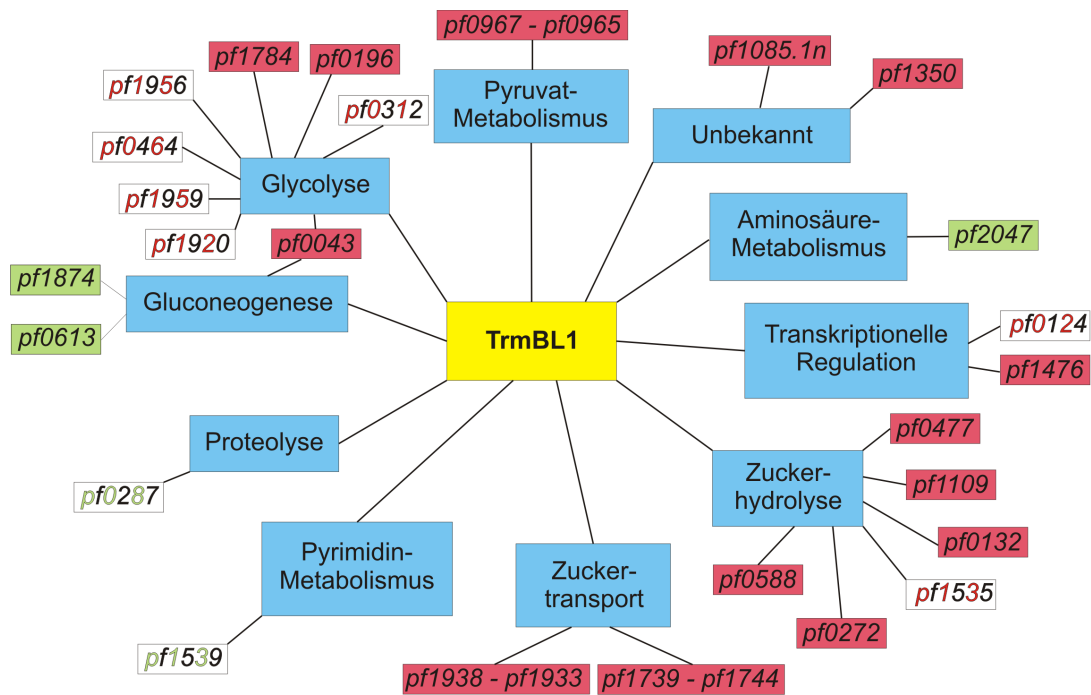


Abbildung IV.2.: **Das Regulationsnetzwerk von TrmBL1.** Die verschiedenen, regulierten Metabolismen sind mit blauen Kästchen gekennzeichnet. Reprimierte Gene sind rot hinterlegt, aktivierte Gene grün. Gene, bei denen eine weitere Regulation durch TrmBL1 vermutet wird, sind zweifarbig dargestellt. Gene: *pf0967-pf0965*, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; *pf1085.1n*, hypothetisches Protein; *pf1350*, vermuteter Transporter; *pf2047*, L-Asparaginase; *pf0124*, TrmBL1; *pf1476*, vermuteter Transkriptionsregulator der PadR-Familie; *pf0477*, extrazelluläre α -Amylase; *pf1109*, vermutetes Stärkebindendes Protein; *pf0132*, ADP-abhängige Glucokinase; *pf1535*, Maltodextrin-Phosphorylase; *pf0272*, 4- α -Glucanotransferase; *pf0588*, Phosphoglycerat-Mutase; *pf1739-pf1744*, TM-System; *pf1938-pf1933*, MD-System; *pf1539*, Dihydroorotat-Dehydrogenase; *pf0287*, Pyrolysin; *pf0613*, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase; *pf1874*, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; *pf0043*, Phosphoenolpyruvat-Synthetase; *pf1920*, Triosephosphat-Isomerase; *pf0464*, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; *pf1956*, Phosphoglycerat-Mutase; *pf1784*, Phosphofructokinase; *pf0196*, Phosphoglucose-Isomerase; *pf0312*, ADP-abhängige Glucokinase

Dennoch ist nicht nur TrmBL1 aus *P. furiosus* ein wichtiger Vertreter der TrmB-Familie, welcher diese vollkommen unterschiedlichen Metabolismen reguliert. Vertreter dieser Proteinfamilie konnten auch in 13 anderen Genera der Euryarchaeoten gefunden werden. Allein 41 Vertreter der Ordnungen *Thermococcales*, *Halobacteriales* und *Thermoplasmatales* codieren TrmB-Orthologe in ihren Genomen [Maruyama *et al.*, 2011]. In den thermophilen Archaeen sind die Transkriptionsfaktoren der TrmB-Familie vor allem in der Regulation des Zuckermetabolismus involviert, hauptsächlich für Maltose- und Glucoseverarbeitung [Van De Werken *et al.*, 2006, Kanai *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2008]. Während die Genloci, die für TrmB codieren, in *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* von Genen für Maltose- und Trehalose-Transporter flankiert werden, sind andere Vertreter der TrmB-Familie als Einzelgene vorhanden. Als Beispiele sind hierfür das Protein Tgr aus *Thermococcus kodakarensis* [Kanai *et al.*, 2007], das halobakterielle Protein VNG1451C aus *Halobacterium salinarum* [Schmid *et al.*, 2009] oder MreA, der Regulator der Methanogenese in *Methanosarcina acetivorans* [Reichlen *et al.*, 2012] zu nennen. Ähnlich zu

TrmBL1 sind auch sie in der Lage entweder nur als Repressor oder als Repressor und Aktivator in den Metabolismus einzugreifen. Zudem konnte auch bei Tgr das TGM als Bindemotiv nachgewiesen und für VNG1451C ein spezifisches Bindemotiv gefunden werden.

Betrachtet man die Proteinstruktur der am besten untersuchten Vertreter etwas genauer, erkennt man, dass alle mittels eines HTH-Motivs an die DNA binden. Dieses Motiv befindet sich bei allen am N-Terminus und Mutationsanalysen konnten belegen, dass diese für eine Bindung an die DNA essentiell ist. Eine wichtige Rolle scheinen dabei die beiden Aminosäuren Tyrosin und Aspartat zu spielen, da diese in nahezu allen gut untersuchten Vertretern zu finden sind. Auch das Vorhandensein eines DNA-Bindemotivs scheint eine tragende Rolle bei der spezifischen Regulation zu besitzen. Zudem enthalten die meisten Proteine eine C-terminale Effektor-Bindedomäne in der sich ebenfalls zwei hoch konservierte Aminosäuren befinden, Glycin und Glutamat. In den meisten Fällen interagieren die Proteine der TrmB-Familie auch mit Inducern wie beispielsweise verschiedenen Zuckern aber auch anderen Repressoren und Kofaktoren. Sie selbst können sowohl als Repressoren, Aktivatoren oder auch als eine Kombination aus beidem agieren.

Aber nicht nur in Euryarchaeoten sondern auch in Crenarchaeoten wie *Sulfolobus acidocaldarius*, *Caldivirga maquilingensis* und *Thermophilum pendens* oder auch im Thaumarchaeon *Nitrosopumilus maritimus*, im Nanoarchaeon *Nanoarchaeum equitans* und im Korarchaeon *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* existieren Vertreter der TrmB-Proteinfamilie, und es wird immer offensichtlicher, dass diese eine äußerst wichtige Rolle in den verschiedensten Metabolismen spielen, auch wenn die Funktion der meisten Vertreter bisher noch ungeklärt ist. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass TrmB in einem Euryarchaeoten entstand und durch horizontalen Gentransfer auf andere Archaeen oder Bakterien übertragen wurde [DiRuggiero *et al.*, 2000]. Die TrmBs der Crenarchaeoten jedoch scheinen auf andere Weise entstanden zu sein, bis auf den Aktivator MalR aus *Sulfolobus acidocaldarius*. Von diesem wird angenommen, dass er ebenfalls durch horizontalen Gentransfer übertragen wurde, da er sich inmitten eines Maltose-Regulons befindet [Wagner *et al.*, 2014].

Die Regulatoren der TrmB-Familie stellen somit eine äußerst interessante Gruppe an Transkriptionsfaktoren dar, und es bleibt zu erwarten, dass ihr universelles Auftreten in allen Domänen des Lebens einen entscheidenden Einfluss auf die unterschiedlichsten Metabolismen besitzt. Bei einigen konnten schon bruchstückhafte Beweise dafür geliefert werden, in anderen sind sie noch vollkommen unerforscht. Bis jedoch das gesamte regulatorische Netzwerk dieser Proteinfamilie bekannt ist, kann noch einige Zeit vergehen. Immerhin handelt es sich hier um ein äußerst komplexes System, in das auch noch andere Transkriptions- und Kofaktoren involviert sind.

Gen	Genname	TGM	EMSA	<i>in vitro</i> Transkription	DNaseI Footprint
pf0043	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	downstream		Repression	
pf0124	TrmBL1	Nein	Ja	Repression	
pf0132	α -Glucosidase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0196	Phosphoglucose-Isomerase	downstream	Ja	Repression	
pf0272	4- α -Glucanotransferase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0287	Pyrolysin	upstream		kein Effekt	
pf0312	ADP-abhängige Glucokinase	downstream	Ja		
pf0464	Glycerinaldehyd-3-P-Ferredoxin-Oxidoreduktase	downstream	Ja		
pf0477	extrazelluläre α -Amylase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf0588	Phosphoglucose-Mutase	downstream	Ja	Repression	
pf0613	Fructose-1,6-Bisphosphatase	upstream	Ja	Aktivierung	Ja
pf0648	Hypothetisches Protein	upstream		kein Effekt	
pf0967	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase UE δ	downstream	Ja	Repression	
pf1085.1n	Hypothetisches Protein	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1109	Hypothetisches Protein, Stärke-bindend	downstream	Ja	Repression	
pf1350	Hypothetisches Protein, möglicher Transporter	downstream	Ja	Repression	
pf1476	vermuteter Transkriptionsregulator, PadR-Familie	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1535	α -Glucan-Phosphorylase	downstream			
pf1539	Dihydroorotat-Dehydrogenase 1b	upstream			
pf1602	Glutamat-Dehydrogenase	Nein	Nein	kein Effekt	Nein
pf1739	Trehalose/Maltose-Bindeprotein (TM-System, <i>mdxE</i>)	Nein	Ja	Repression	
pf1784	Phosphofruktokinase	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1874	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	upstream	Ja	Aktivierung	Ja
pf1920	Triosephosphat-Isomerase	downstream	Ja		
pf1938	Maltodextrin-Bindeprotein (MD-System, <i>malE</i>)	downstream	Ja	Repression	Ja
pf1956	Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase	downstream			
pf1959	Phosphoglycerat-Mutase	downstream	Ja		
pf2047	L-Asparaginase	upstream	Ja	Aktivierung	Ja

Abbildung IV.3.: **Zusammenfassung aller bisher bekannten Ergebnisse zu *in vitro* Versuchen mit TrmBL1.** Grün hinterlegte Gene sind bereits bekannt, gelb hinterlegte wurden vermutet, blau hinterlegte wurden neu gefunden. [Van De Werken *et al.*, 2006, Verhees *et al.*, 2001, Siebers *et al.*, 2001, van der Oost *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2007a, Lee *et al.*, 2008]

V. Zusammenfassung

Die Hypothese zur differentiellen Bindefähigkeit von TrmB und TrmBL1 an den TM- und MD-Promotor via verschiedener Bindehelices konnte durch *in vitro* Transkriptionen mit Proteinen, in denen die beiden betroffenen Helices vertauscht wurden, nur für den TM-Promotor bestätigt werden. Für den MD-Promotor blieben die erwarteten Resultate aus oder trafen nur bedingt zu. Aufgrund neuerer Strukturdaten zu TrmB wird nun vermutet, dass eine Regulation der beiden Promotoren nicht über verschiedene Helices stattfindet, sondern eher auf den verschiedenen Konformationen der Proteine beruht. Nähere Daten dazu sind jedoch bisher nicht bekannt.

Mit Hilfe des an diesem Lehrstuhl von Frau Dr. Ingrid Waage etablierten Systems wurde eine Simvastatinresistenzkassette in *Pyrococcus furiosus* eingebracht sowie eine TrmBL1-Deletionsmutante mit der gleichen Antibiotikaresistenz erstellt. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten der *trmBL1*-Deletionsmutante gegenüber dem Simvastatin-resistenten Wildtyp in 1/2-SME-Medium mit je 0,1 % Stärke, Hefeextrakt und Pyruvat untersucht. Dieses zeigte keine Unterschiede der beiden Stämme. Sowohl der Wildtyp als auch die Deletionsmutante vermehrten sich mit nahezu gleicher Wachstumsrate und erreichten annähernd gleiche Zelldichten. Durch ChIP-Seq-Versuch von Robert Reichelt wurde im Laufe dieser Arbeit jedoch festgestellt, dass der als Wildtyp bezeichnete Stamm eine Deletion der Gene *pf1737* bis *pf1751* besitzt. Somit ist auch das Gen für TrmB deletiert. Der „Wildtyp“-Stamm ist daher bereits eine *trmB*-Deletionsmutante und die neu etablierte *trmBL1*-Deletionsmutante somit eine Doppelmutante. Umso erstaunlicher ist, dass unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen trotzdem kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden konnte. Nur ein Vergleich der Phänotypen zeigt, dass die Doppelmutante kleinere Zellen hervorbringt. Weitere Versuche mit veränderten Medienkompositionen könnten hier einen entscheidenden Unterschied im Wachstumsverhalten bringen.

In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Versuche zur Regulation durch TrmBL1 an neu gefundenen Promotoren konnten bestätigen, dass TrmBL1 auch an der Regulation des Metabolismus außerhalb des Zuckerstoffwechsels beteiligt ist. In EMSA-Experimenten konnte eine Bindung von TrmBL1 an alle Promotoren, bei denen auch *in vivo* eine Bindung gefunden wurde, nachgewiesen werden. Zudem konnte an allen getesteten Promotoren (bis auf *pf0287* und *pf0648* mit einem TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box) *in vitro* eine Hemmung oder Aktivierung der Transkription gefunden werden. Auch das bereits bekannte Schema mit Bindung an das TGM und die nach dessen Lage daraus resultierende Aktivierung oder Repression der Transkription durch TrmBL1 konnte an den Promotoren nachgewiesen und durch DNaseI Footprinting Analysen die Wichtigkeit des TGM an der Regulation der Promotoren bekräftigt werden.

Bei der Untersuchung des vermuteten Transkriptionsfaktors aMBF1 konnte in EMSA-Versuchen festgestellt werden, dass keine direkte Bindung von aMBF1 an die DNA erfolgt. Erste *in vitro* Transkriptionsversuche mit dem Transkriptionsfaktor ergaben jedoch, dass dieser durchaus in der Lage ist, die Transkriptionsaktivität zu steigern. An manchen Promotoren sogar um das 2,7-fache der basalen Transkriptionsaktivität. Die Hypothese, dass aMBF1 durch Wechselwirkung mit TrmBL1 an der Aktivierung der Transkription von Promotoren mit TGM stromaufwärts der BRE/TATA-Box beteiligt ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

VI. Summary

The hypothesis of TrmB and TrmBL1 binding with different helices to the TM and MD promoter could only be proven for the TM promoter. The expected results of the mutated proteins with switched binding helices could be shown at the MD promoter just partly, if at all. New structural data of the TrmB protein also suggest a different regulatory mechanism which is based on conformational changes. Further details are unknown at the moment.

A simvastatin resistant *Pyrococcus furiosus* wildtype clone and a simvastatin resistant TrmBL1 knockout mutant was successfully created via Dr. Ingrid Waegel's system. Its growth was analyzed on 1/2 SME medium containing 0.1 % starch, yeast extract and pyruvate, respectively. Growing curves of the simvastatin resistant wildtype compared with the knockout mutant showed an almost identical growth rate and similar cell densities. ChIP-Seq analysis of Robert Reichelt revealed a deletion of the genes *pf1737* to *pf1751*. Therefore also the gene for TrmB is deleted. That means, the wildtype stem is also a knockout mutant and the new established *trmBL1* knockout mutant is therefore a mutated double knockout. Even more surprising is the fact that under the tested conditions no difference in growth could be observed. Just a comparison of the two phenotypes revealed a smaller cell size of the double knockout mutant. Further experiments with altered media could show an important difference in growth behavior.

Indeed, this thesis shows that TrmBL1 is part of a regulatory mechanism beyond sugar metabolism. EMSA experiments showed a binding of TrmBL1 to all promoters which were found *in vivo*. Furthermore, a repression or activation of transcription by TrmBL1 could be shown at all tested promoters *in vitro* (excluding *pf0287* and *pf0648* with a TGM upstream of the BRE/TATA-box). Nevertheless, the distinct pattern of TrmBL1 binding to the TGM and its effect on activation or repression of transcription could be shown for all promoters and DNaseI footprinting analysis could confirm the importance of the TGM for their regulation.

Studies with the assumed transcription factor aMBF1 showed no direct binding of aMBF1 to DNA in EMSA experiments. Nevertheless, first *in vitro* transcriptions with aMBF1 led to an increased activity at all tested promoters, to some extent even 2.7-fold the amount compared to basal transcription activity. The hypothesis of aMBF1 interacting with TrmBL1 to activate transcription at promoters with TGM upstream of the BRE/TATA-box could not be proven.

VII. Abkürzungen

1. Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Bequerelle
BRE	<i>factor B recognition element</i>
BSA	<i>bovine serum albuminum</i> ; Rinderserumalbumin
c	Konzentration
ddNTP	Di-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	Deoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
<i>et al.</i>	et alii
Fd _{ox}	oxidiertes Ferredoxin
Fd _{red}	reduziertes Ferredoxin
g	Gravitation der Erde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
His ₆ -tag	Anhang von sechs Histidinen an ein Protein
HTH	helix turn helix
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen (-paare)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
Mb	Megabasen
min	Minute

mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD _x	optische Dichte bei x nm
ORF	<i>open reading frame</i> ; Leserahmen
P _i	Phosphat
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PIC	Präinitiationskomplex
PNK	Polynukleotid-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	DNA abhängige RNA-Polymerase
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box Bindeprotein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
TFE	Transkriptionsfaktor E
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
wHTH	winged helix turn helix
wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

2. Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin

3. Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin			

VIII. Abbildungsverzeichnis

I.1.	<i>Pyrococcus furiosus</i>	1
I.2.	Stärke- und Maltose-Metabolismus in <i>Pyrococcus furiosus</i>	3
I.3.	Energiekonservierung in <i>Pyrococcus furiosus</i>	4
I.4.	Glycolyse und Gluconeogenese in <i>Pyrococcus furiosus</i>	7
I.5.	Transkriptionsinitiation in Archaeen und Eukaryoten	9
I.6.	Verteilung von Proteinen der TrmB-Familie in verschiedenen <i>Thermococcales</i>	11
I.7.	Gencluster des Trehalose/Maltose- und des Maltodextrin-Operons	12
I.8.	Aufbau des <i>malE</i> - und des <i>mdxE</i> -Promotors	13
I.9.	Gesamtstruktur eines TrmB-Monomers	14
I.10.	TrmB als Dimer sowie seine CC-Helix	15
I.11.	Die Zuckerbindedomäne mit komplexierter Sucrose	15
I.12.	Modell zur Regulationsweise von TrmBL1	17
II.1.	Konstruktion des Fusions-PCR-Fragmentes für den <i>P. furiosus</i> Wildtyp mit Simvastatinresistenz	26
II.2.	Konstruktion des Fusions-PCR-Fragmentes für die <i>P. furiosus</i> pf0124-Deletionsmutante mit Simvastatinresistenz	26
III.1.	Aminosäuresequenzen der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB und TrmBL1	44
III.2.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit TrmB- und TrmBL1-Wildtyp sowie deren Helixmutanten am TM-Promotor	45
III.3.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit TrmB- und TrmBL1-Wildtyp sowie deren Helixmutanten am MD-Promotor	46
III.4.	Erzeugung von <i>P. furiosus</i> MURPf33 und MURPf34	47
III.5.	Wachstumskurven von <i>P. furiosus</i> MURPf33 und MURPf34	48
III.6.	Übersicht der getesteten Promotoren auf Regulation durch TrmBL1	49
III.7.	Kontroll-EMSAs an bereits bekannten Promotoren	50
III.8.	Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren - Teil 1	52
III.9.	Bindung von TrmBL1 an die neu identifizierten Promotoren - Teil 2	53
III.10.	Kontroll-Transkriptionen	54
III.11.	Repression der Transkription an den neuen Promotoren - Teil 1	56
III.12.	Repression der Transkription an den neuen Promotoren - Teil 2	57
III.13.	Promotoren ohne Regulation	58
III.14.	Aktivierung der Transkription an den neu identifizierten Promotoren	59
III.15.	EMSA mit aMBF1 an verschiedenen Promotoren	60

III.16.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit aMBF1	62
III.17.	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit aMBF1 und TrmBL1	63
III.18.	DNaseI Footprinting-Analysen der durch TrmBL1 reprimierten Promotoren .	65
III.19.	DNaseI Footprinting-Analysen der durch TrmBL1 aktivierten Promotoren . .	66
III.20.	Erzielte Ergebnisse aller <i>in vitro</i> Versuche mit TrmBL1	68
IV.1.	Alignment der Aminosäuresequenzen der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB und TrmBL1	70
IV.2.	Regulationsnetzwerk von TrmBL1	78
IV.3.	Zusammenfassung aller bisher bekannten Ergebnisse zu <i>in vitro</i> Versuchen mit TrmBL1	80
X.1.	Der <i>pf0043</i> -Promotor	101
X.2.	Der <i>pf0132</i> -Promotor	102
X.3.	Der <i>pf0196</i> -Promotor	103
X.4.	Der <i>pf0272</i> -Promotor	104
X.5.	Der <i>pf0287</i> -Promotor	105
X.6.	Der <i>pf0477</i> -Promotor	106
X.7.	Der <i>pf0588</i> -Promotor	107
X.8.	Der <i>pf0613</i> -Promotor	108
X.9.	Der <i>pf0648</i> -Promotor	109
X.10.	Der <i>pf0967</i> -Promotor	110
X.11.	Der <i>pf1085.1n</i> -Promotor	111
X.12.	Der <i>pf1109</i> -Promotor	112
X.13.	Der <i>pf1350</i> -Promotor	113
X.14.	Der <i>pf1476</i> -Promotor	114
X.15.	Der <i>pf1602</i> -Promotor	115
X.16.	Der <i>pf1739</i> -Promotor	116
X.17.	Der <i>pf1784</i> -Promotor	117
X.18.	Der <i>pf1874</i> -Promotor	118
X.19.	Der <i>pf1938</i> -Promotor	119
X.20.	Der <i>pf2047</i> -Promotor	120
X.21.	Proteinreinigung TrmB	121
X.22.	Proteinreinigung TrmBL1	122
X.23.	Proteinreinigung TrmB mit RH1 von TrmBL1	123
X.24.	Proteinreinigung TrmBL1 mit RH1 von TrmB	124
X.25.	Proteinreinigung aMBF1	125

IX. Literaturverzeichnis

- [Adams *et al.*, 2001] Adams, M. W., Holden, J. F., Menon, A. L., Schut, G. J., Grunden, A. M., Hou, C., Hutchins, A. M., Jenney, F. E., Kim, C., Ma, K., *et al.* (2001). Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 183(2):716–724.
- [Aravind und Koonin, 1999] Aravind, L. and Koonin, E. V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. Nucleic Acids Research, 27(23):4658–4670.
- [Bansal *et al.*, 2010] Bansal, S., Gnaneswari, D., Mishra, P., and Kundu, B. (2010). Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from *Pyrococcus furiosus*. Biochemistry (Moscow), 75(3):375–381.
- [Bell, 2005] Bell, S. D. (2005). Archaeal transcriptional regulation – variation on a bacterial theme? Trends in Microbiology, 13(6):262–265.
- [Bell *et al.*, 1999] Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L., and Jackson, S. P. (1999). Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. Molecular Cell, 4(6):971–982.
- [Bell und Jackson, 2001] Bell, S. D. and Jackson, S. P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. Current Opinion in Microbiology, 4(2):208–213.
- [Blamey und Adams, 1993] Blamey, J. M. and Adams, M. W. (1993). Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1161(1):19–27.
- [Bräsen *et al.*, 2014] Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., and Siebers, B. (2014). Carbohydrate metabolism in archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(1):89–175.
- [Bräsen *et al.*, 2008] Bräsen, C., Schmidt, M., Grötzinger, J., and Schönheit, P. (2008). Reaction mechanism and structural model of ADP-forming acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Evidence for a second active site histidine residue. Journal of Biological Chemistry, 283(22):15409–15418.
- [Busby und Ebright, 1994] Busby, S. and Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. Cell, 79(5):743–746.
- [Coto *et al.*, 2011] Coto, J. M., Ehrenhofer-Murray, A. E., Pons, T., and Siebers, B. (2011). Functional analysis of archaeal MBF1 by complementation studies in yeast. Biology direct, 6(1):1–18.

- [Daniel und Danson, 1995] Daniel, R. M. and Danson, M. J. (1995). Did primitive microorganisms use nonhem iron proteins in place of NAD/P? Journal of Molecular Evolution, 40(6):559–563.
- [de Koning *et al.*, 2009] de Koning, B., Blombach, F., Wu, H., Brouns, S. J., and van der Oost, J. (2009). Role of multiprotein bridging factor 1 in archaea: bridging the domains? Biochemical Society Transactions, 37(1):52–57.
- [de Vos *et al.*, 1998] de Vos, W. M., Kengen, S. W., Voorhorst, W. G., and van der Oost, J. (1998). Sugar utilization and its control in hyperthermophiles. Extremophiles, 2(3):201–205.
- [Di Fiore *et al.*, 2009] Di Fiore, A., Fiorentino, G., Vitale, R. M., Ronca, R., Amodeo, P., Pedone, C., Bartolucci, S., and De Simone, G. (2009). Structural analysis of BldR from *Sulfolobus solfataricus* provides insights into the molecular basis of transcriptional activation in archaea by MarR family proteins. Journal of Molecular Biology, 388(3):559–569.
- [DiRuggiero *et al.*, 2000] DiRuggiero, J., Dunn, D., Maeder, D. L., Holley-Shanks, R., Chatard, J., Horlacher, R., Robb, F. T., Boos, W., and Weiss, R. B. (2000). Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. Molecular Microbiology, 38(4):684–693.
- [Du *et al.*, 2011] Du, J., Say, R. F., Lü, W., Fuchs, G., and Einsle, O. (2011). Active-site remodelling in the bifunctional fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase. Nature, 478(7370):534–537.
- [Eggen *et al.*, 1990] Eggen, R., Geerling, A., Watts, J., and de Vos, W. M. (1990). Characterization of pyrolysin, a hyperthermoactive serine protease from the archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. FEMS Microbiology Letters, 71(1-2):17–20.
- [Fabian *et al.*, 2014] Fabian, B., Helene, L., Ambrosius, P., Violeta, Z., Hao, W., Bart, d. K., Stan, J., Thijs, E., Carlo, C., Andrea, C., *et al.* (2014). Archaeal MBF1 binds to 30S and 70S ribosomes via its helix-turn-helix domain. Biochemical Journal, 462(2):373–384.
- [Fiala und Stetter, 1986] Fiala, G. and Stetter, K. O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100°C. Archives of Microbiology, 145(1):56–61.
- [Geiduschek und Ouhammouch, 2005] Geiduschek, E. P. and Ouhammouch, M. (2005). Micro Review: Archaeal transcription and its regulators. Molecular Microbiology, 56(6):1397–1407.
- [Grohmann und Werner, 2011] Grohmann, D. and Werner, F. (2011). Recent advances in the understanding of archaeal transcription. Current Opinion in Microbiology, 14(3):328–334.
- [Grünberg *et al.*, 2007] Grünberg, S., Bartlett, M. S., Naji, S., and Thomm, M. (2007). Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. Journal of Biological Chemistry, 282(49):35482–35490.
- [Hanahan, 1983] Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology, 166(4):557–580.

- [Hausner *et al.*, 1991] Hausner, W., Frey, G., and Thomm, M. (1991). Control regions of an archaeal gene: a TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA_{Val} gene of *Methanococcus vannielii*. Journal of Molecular Biology, 222(3):495–508.
- [Hausner und Thomm, 2001] Hausner, W. and Thomm, M. (2001). Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. Journal of Bacteriology, 183(10):3025–3031.
- [Hausner *et al.*, 1996] Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., and Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. Journal of Biological Chemistry, 271(47):30144–30148.
- [Hethke *et al.*, 1996] Hethke, C., Geerling, A. C., Hausner, W., de Vos, W. M., and Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Nucleic Acids Research, 24(12):2369–2376.
- [Higuchi, 1990] Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. PCR protocols: a guide to methods and applications, 177.
- [Horlacher *et al.*, 1998] Horlacher, R., Xavier, K. B., Santos, H., DiRuggiero, J., Kossmann, M., and Boos, W. (1998). Archaeal binding protein-dependent ABC transporter: molecular and biochemical analysis of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Journal of Bacteriology, 180(3):680–689.
- [Huet *et al.*, 1983] Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A., and Zillig, W. (1983). Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. The EMBO Journal, 2(8):1291.
- [Hutchins *et al.*, 2001] Hutchins, A. M., Holden, J. F., and Adams, M. W. (2001). Phosphoenolpyruvate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 183(2):709–715.
- [Imamura *et al.*, 2004] Imamura, H., Jeon, B.-S., and Wakagi, T. (2004). Molecular evolution of the ATPase subunit of three archaeal sugar ABC transporters. Biochemical and Biophysical Research Communications, 319(1):230–234.
- [Imanaka *et al.*, 2006] Imanaka, H., Yamatsu, A., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2006). Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*. Molecular Microbiology, 61(4):898–909.
- [Inoue *et al.*, 1990] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, 96(1):23–28.
- [Kabe *et al.*, 1999] Kabe, Y., Goto, M., Shima, D., Imai, T., Wada, T., Morohashi, K.-I., Shirakawa, M., Hirose, S., and Handa, H. (1999). The role of human MBF1 as a transcriptional coactivator. Journal of Biological Chemistry, 274(48):34196–34202.

- [Kanai *et al.*, 2007] Kanai, T., Akerboom, J., Takedomi, S., van de Werken, H. J., Blombach, F., van der Oost, J., Murakami, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007). A global transcriptional regulator in *Thermococcus kodakaraensis* controls the expression levels of both glycolytic and gluconeogenic enzyme-encoding genes. Journal of Biological Chemistry, 282(46):33659–33670.
- [Keeling und Doolittle, 1995] Keeling, P. J. and Doolittle, W. F. (1995). Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(13):5761–5764.
- [Kengen *et al.*, 1994] Kengen, S., De Bok, F., Van Loo, N., Dijkema, C., Stams, A., and De Vos, W. (1994). Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry, 269(26):17537–17541.
- [Kengen *et al.*, 1996] Kengen, S., Stams, A. J., Vos, W. M., *et al.* (1996). Sugar metabolism of hyperthermophiles. FEMS Microbiology Reviews, 18(2-3):119–137.
- [Kengen *et al.*, 1995] Kengen, S. W., Tuininga, J. E., de Bok, F. A., Stams, A. J., and de Vos, W. M. (1995). Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry, 270(51):30453–30457.
- [Kletzin und Adams, 1996] Kletzin, A. and Adams, M. (1996). Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. Journal of Bacteriology, 178(1):248–257.
- [Koide *et al.*, 2009] Koide, T., Reiss, D. J., Bare, J. C., Pang, W. L., Facciotti, M. T., Schmid, A. K., Pan, M., Marzolf, B., Van, P. T., Lo, F.-Y., *et al.* (2009). Prevalence of transcription promoters within archaeal operons and coding sequences. Molecular Systems Biology, 5(1):1–16.
- [Koning *et al.*, 2002a] Koning, S. M., Albers, S.-V., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2002a). Sugar transport in (hyper)-thermophilic archaea. Research in Microbiology, 153(2):61–67.
- [Koning *et al.*, 2001] Koning, S. M., Elferink, M. G., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2001). Cellobiose uptake in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is mediated by an inducible, high-affinity ABC transporter. Journal of Bacteriology, 183(17):4979–4984.
- [Koning *et al.*, 2002b] Koning, S. M., Konings, W. N., and Driessen, A. J. (2002b). Biochemical evidence for the presence of two α -glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Archaea, 1(1):19–25.
- [Krug *et al.*, 2013] Krug, M., Lee, S.-J., Boos, W., Diederichs, K., and Welte, W. (2013). The three-dimensional structure of TrmB, a transcriptional regulator of dual function in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in complex with sucrose. Protein Science, 22(6):800–808.

- [Krug *et al.*, 2006] Krug, M., Lee, S.-J., Diederichs, K., Boos, W., and Welte, W. (2006). Crystal structure of the sugar binding domain of the archaeal transcriptional regulator TrmB. Journal of Biological Chemistry, 281(16):10976–10982.
- [Kyrpides und Ouzounis, 1999] Kyrpides, N. C. and Ouzounis, C. A. (1999). Transcription in archaea. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(15):8545–8550.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. Nature, 227:680–685.
- [Lee *et al.*, 2006] Lee, H.-S., Shockley, K. R., Schut, G. J., Connors, S. B., Montero, C. I., Johnson, M. R., Chou, C.-J., Bridger, S. L., Wigner, N., Brehm, S. D., *et al.* (2006). Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 188(6):2115–2125.
- [Lee *et al.*, 2003] Lee, S.-J., Engelmann, A., Horlacher, R., Qu, Q., Vierke, G., Hebbeln, C., Thomm, M., and Boos, W. (2003). TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Journal of Biological Chemistry, 278(2):983–990.
- [Lee *et al.*, 2005] Lee, S.-J., Moulakakis, C., Koning, S. M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2005). TrmB, a sugar sensing regulator of ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers. Molecular Microbiology, 57(6):1797–1807.
- [Lee *et al.*, 2008] Lee, S.-J., Surma, M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2008). The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Archives of Microbiology, 190(3):247–256.
- [Lee *et al.*, 2007a] Lee, S.-J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007a). Characterization of the TrmB-like protein, PF0124, a TGM-recognizing global transcriptional regulator of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Molecular Microbiology, 65(2):305–318.
- [Lee *et al.*, 2007b] Lee, S.-J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007b). Differential signal transduction via TrmB, a sugar sensing transcriptional repressor of *Pyrococcus furiosus*. Molecular Microbiology, 64(6):1499–1505.
- [Li *et al.*, 1994] Li, F.-Q., Ueda, H., and Hirose, S. (1994). Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. Molecular and Cellular Biology, 14(5):3013–3021.
- [Littlefield *et al.*, 1999] Littlefield, O., Korkhin, Y., and Sigler, P. B. (1999). The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(24):13668–13673.
- [Liu *et al.*, 2007] Liu, Q.-X., Nakashima-Kamimura, N., Ikeo, K., Hirose, S., and Gojobori, T. (2007). Compensatory change of interacting amino acids in the coevolution of transcriptional coactivator MBF1 and TATA-Box-binding protein. Molecular Biology and Evolution, 24(7):1458–1463.

- [Mai und Adams, 1996] Mai, X. and Adams, M. (1996). Purification and characterization of two reversible and ADP-dependent acetyl coenzyme A synthetases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 178(20):5897–5903.
- [Marrero Coto, 2010] Marrero Coto, J. (2010). Transcription regulation in the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax* strain Kra1. PhD thesis, Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie, Biofilm Center.
- [Maruyama *et al.*, 2011] Maruyama, H., Shin, M., Oda, T., Matsumi, R., Ohniwa, R. L., Itoh, T., Shirahige, K., Imanaka, T., Atomi, H., Yoshimura, S. H., *et al.* (2011). Histone and TK0471/TrmBL2 form a novel heterogeneous genome architecture in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Molecular Biology of the Cell, 22(3):386–398.
- [Matsubara *et al.*, 2011] Matsubara, K., Yokooji, Y., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011). Biochemical and genetic characterization of the three metabolic routes in *Thermococcus kodakarensis* linking glyceraldehyde-3-phosphate and 3-phosphoglycerate. Molecular Microbiology, 81(5):1300–1312.
- [Matsushita *et al.*, 2002] Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M., and Nyunoya, H. (2002). Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. Journal of Experimental Botany, 53(373):1531–1532.
- [Mayer und Müller, 2014] Mayer, F. and Müller, V. (2014). Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. FEMS Microbiology Reviews, 38(3):449–472.
- [Meyer und Lamberts, 1965] Meyer, T. and Lamberts, B. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 107(1):144–145.
- [Miroux und Walker, 1996] Miroux, B. and Walker, J. E. (1996). Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. Journal of Molecular Biology, 260(3):289–298.
- [Mukund und Adams, 1995] Mukund, S. and Adams, M. W. (1995). Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry, 270(15):8389–8392.
- [Mullis *et al.*, 1992] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Biotechnology Series, page 17.
- [Ochs *et al.*, 2012] Ochs, S. M., Thumann, S., Richau, R., Weirauch, M. T., Lowe, T. M., Thomm, M., and Hausner, W. (2012). Activation of archaeal transcription mediated by recruitment of transcription factor B. Journal of Biological Chemistry, 287(22):18863–18871.

- [Ouhammouch *et al.*, 2003] Ouhammouch, M., Dewhurst, R. E., Hausner, W., Thomm, M., and Geiduschek, E. P. (2003). Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(9):5097–5102.
- [Peeters *et al.*, 2013] Peeters, E., Peixeiro, N., and Sezonov, G. (2013). Cis-regulatory logic in archaeal transcription. Biochemical Society Transactions, 41(1):326–331.
- [Pérez-Rueda und Janga, 2010] Pérez-Rueda, E. and Janga, S. C. (2010). Identification and genomic analysis of transcription factors in archaeal genomes exemplifies their functional architecture and evolutionary origin. Molecular Biology and Evolution, 27(6):1449–1459.
- [Pisa *et al.*, 2007] Pisa, K. Y., Huber, H., Thomm, M., and Müller, V. (2007). A sodium ion-dependent A_1A_O ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Febs Journal, 274(15):3928–3938.
- [Poole *et al.*, 2005] Poole, F. L., Gerwe, B. A., Hopkins, R. C., Schut, G. J., Weinberg, M. V., Jenney, F. E., and Adams, M. W. (2005). Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes. Journal of Bacteriology, 187(21):7325–7332.
- [Reichlen *et al.*, 2012] Reichlen, M. J., Vepachedu, V. R., Murakami, K. S., and Ferry, J. G. (2012). MreA functions in the global regulation of methanogenic pathways in *Methanosarcina acetivorans*. mBio, 3(4):e00189–12.
- [Reiter *et al.*, 1990] Reiter, W.-D., Hüdepohl, U., and Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(24):9509–9513.
- [Sakuraba und Ohshima, 2002] Sakuraba, H. and Ohshima, T. (2002). Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway. Journal of Bioscience and Bioengineering, 93(5):441–448.
- [Sambrook *et al.*, 1989] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, volume 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [Sapra *et al.*, 2003] Sapra, R., Bagramyan, K., and Adams, M. W. (2003). A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(13):7545–7550.
- [Sato *et al.*, 2004] Sato, T., Imanaka, H., Rashid, N., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2004). Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles. Journal of Bacteriology, 186(17):5799–5807.
- [Say und Fuchs, 2010] Say, R. F. and Fuchs, G. (2010). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. Nature, 464(7291):1077–1081.

- [Schäfer und Schönheit, 1991] Schäfer, T. and Schönheit, P. (1991). Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Archives of Microbiology, 155(4):366–377.
- [Schäfer und Schönheit, 1992] Schäfer, T. and Schönheit, P. (1992). Maltose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for the operation of a novel sugar fermentation pathway. Archives of Microbiology, 158(3):188–202.
- [Schäfer und Schönheit, 1993] Schäfer, T. and Schönheit, P. (1993). Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. Archives of Microbiology, 159(4):354–363.
- [Schicho *et al.*, 1993] Schicho, R. N., Ma, K., Adams, M. W., and Kelly, R. M. (1993). Bioenergetics of sulfur reduction in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 175(6):1823–1830.
- [Schmid *et al.*, 2009] Schmid, A. K., Reiss, D. J., Pan, M., Koide, T., and Baliga, N. S. (2009). A single transcription factor regulates evolutionarily diverse but functionally linked metabolic pathways in response to nutrient availability. Molecular Systems Biology, 5(1):1–15.
- [Schönheit und Schäfer, 1995] Schönheit, P. and Schäfer, T. (1995). Metabolism of hyperthermophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(1):26–57.
- [Schut *et al.*, 2013] Schut, G. J., Boyd, E. S., Peters, J. W., and Adams, M. W. (2013). The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. FEMS Microbiology Reviews, 37(2):182–203.
- [Schut *et al.*, 2003] Schut, G. J., Brehm, S. D., Datta, S., and Adams, M. W. (2003). Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. Journal of Bacteriology, 185(13):3935–3947.
- [Shapiro *et al.*, 1967] Shapiro, A. L., Viñuela, E., *et al.* (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications, 28(5):815–820.
- [Siebers *et al.*, 2001] Siebers, B., Brinkmann, H., Dörr, C., Tjaden, B., Lilie, H., van der Oost, J., and Verhees, C. H. (2001). Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. Journal of Biological Chemistry, 276(31):28710–28718.
- [Siebers und Schönheit, 2005] Siebers, B. and Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in archaea. Current Opinion in Microbiology, 8(6):695–705.
- [Soppa, 1999] Soppa, J. (1999). Transcription initiation in archaea: facts, factors and future aspects. Molecular Microbiology, 31(5):1295–1305.

- [Surma, 2011] Surma, M. (2011). Charakterisierung von TrmB und TrmBL1, zwei Transkriptionsregulatoren im Zentrum des Zuckerstoffwechsels von *Pyrococcus furiosus*. PhD thesis, Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin.
- [Takemaru *et al.*, 1997] Takemaru, K.-I., Li, F.-Q., Ueda, H., and Hirose, S. (1997). Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(14):7251–7256.
- [Thomm, 1996] Thomm, M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. FEMS Microbiology Reviews, 18(2-3):159–171.
- [Thomm und Wich, 1988] Thomm, M. and Wich, G. (1988). An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. Nucleic Acids Research, 16(1):151–163.
- [Tuininga *et al.*, 1999] Tuininga, J. E., Verhees, C. H., van der Oost, J., Kengen, S. W., Stams, A. J., and de Vos, W. M. (1999). Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry, 274(30):21023–21028.
- [Ullmann *et al.*, 1967] Ullmann, A., Jacob, F., and Monod, J. (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, 24(2):339–343.
- [Van De Werken *et al.*, 2006] Van De Werken, H. J., Verhees, C. H., Akerboom, J., De Vos, W. M., and Van Der Oost, J. (2006). Identification of a glycolytic regulon in the archaea *Pyrococcus* and *Thermococcus*. FEMS Microbiology Letters, 260(1):69–76.
- [van der Oost *et al.*, 1998] van der Oost, J., Schut, G., Kengen, S. M., Hagen, W. R., Thomm, M., and de Vos, W. M. (1998). The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. Journal of Biological Chemistry, 273(43):28149–28154.
- [VanFossen *et al.*, 2008] VanFossen, A. L., Lewis, D. L., Nichols, J. D., and Kelly, R. M. (2008). Polysaccharide degradation and synthesis by extremely thermophilic anaerobes. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125(1):322–337.
- [Verhees *et al.*, 2003] Verhees, C., Kengen, S., Tuininga, J., Schut, G., Adams, M., de Vos, W., and Van Der Oost, J. (2003). The unique features of glycolytic pathways in archaea. Biochemical Journal, 375:231–246.
- [Verhees *et al.*, 2002] Verhees, C. H., Akerboom, J., Schiltz, E., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2002). Molecular and biochemical characterization of a distinct type of fructose-1,6-bisphosphatase from *Pyrococcus furiosus*. Journal of Bacteriology, 184(12):3401–3405.

- [Verhees *et al.*, 2001] Verhees, C. H., Huynen, M. A., Ward, D. E., Schiltz, E., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2001). The phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a unique glycolytic enzyme that belongs to the cupin superfamily. Journal of Biological Chemistry, 276(44):40926–40932.
- [Vierke *et al.*, 2003] Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C., and Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. Journal of Biological Chemistry, 278(1):18–26.
- [Voorhorst *et al.*, 1996] Voorhorst, W. G., Eggen, R. I., Geerling, A. C., Platteeuw, C., Siezen, R. J., and de Vos, W. M. (1996). Isolation and characterization of the hyperthermostable serine protease, pyrolysin, and its gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry, 271(34):20426–20431.
- [Waege, 2014] Waege, I. (2014). Charakterisierung von RNA-Polymerase-Mutanten und von Transkriptionsfaktoren mit Hilfe des genetischen Systems von *Pyrococcus furiosus*. PhD thesis, Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin.
- [Wagner *et al.*, 2014] Wagner, M., Wagner, A., Ma, X., Kort, J. C., Ghosh, A., Rauch, B., Siebers, B., and Albers, S.-V. (2014). Investigation of the malE promoter and MalR, a positive regulator of the maltose regulon, for an improved expression system in *Sulfolobus acidocaldarius*. Applied and Environmental Microbiology, 80(3):1072–1081.
- [Wang *et al.*, 2007] Wang, M., Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Schut, G. J., Adams, M. W., Amster, I. J., Thomm, M., and Scott, R. A. (2007). Discovery of regulatory transcription factors involved in cellular response. Regulation of sugar metabolism in *Pyrococcus furiosus*. not published.
- [Wilfinger *et al.*, 1997] Wilfinger, W., Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques, 22(3):474–476.
- [Woese *et al.*, 1990] Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(12):4576–4579.
- [Xavier *et al.*, 1996] Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., and Santos, H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Journal of Bacteriology, 178(16):4773–4777.
- [Zeller, 2011] Zeller, M. E. (2011). Die Funktion von Transkriptionsfaktor (II) B und Mechanismus der Transkriptionsinitiation. PhD thesis, Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin.
- [Zillig *et al.*, 1979] Zillig, W., Stetter, K. O., and Janežovič, D. (1979). DNA-dependent RNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. European Journal of Biochemistry, 96(3):597–604.

X. Anhang

1. Promotorstrukturen

Der Phosphoenolpyruvat-Synthase-Promotor (*pf0043*)

```
pf0043_-120_F
aatgctcatcatttagttttatgacaataatgaacatcaaaccctttcttgattcacgtt < 60
ttacgagtagtaaatcaaaatactgttattacttgtagtttggggaagaactaagtgcaa

                                pf0043 →
                                +1
aattttaaatatagctcacctttatcactcacggttattttaaggcggaggtgaactgaa < 120
ttaaattttatatcgagtggaaatagtgagtgc caataa aattccgcctccacttgactt
                                TGM
┌ PEPS
ATG GCATACAGATTCATAAAGTGGTTTGAGGAGCTAAGCAAAAATGATGTCCCACTTGTT < 180
TACCGTATGTCTAAGTATTTACCAAACCTCCTCGATTTCGTTTTTACTACAGGGTGAACAA

GGTGGAAAGGGTGCAAATCTTGGTGAAATGACAAATGCTGGAATTCCAGTTCCACCAGGA < 240
CCACCTTTCCACGTTTAGAACCACTTTACTGTTTACGACCTTAAGGTCAAGGTGGTCCT
                                pf0043_+120_R_FAM
```

Abbildung X.1.: **Der *pf0043*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Der Transkriptionsstart ist in hellblau mit +1 angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der α -Glucosidase-Promotor (*pf0132*)

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggtac < 60
 cggccccaaaaggggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

BamHI
 ccgatccGACCCGGTTGATAGGGCGGGGATGTAAGCGGGAAGGGTCAACCGACCCGCTTA < 120
 ggctaggCTGGGCCAACTATCCCGCCCCCTACATTCGCCCTTCCCAGTTGGCTGGGCGAAT

GTCCGCCGCCCTAATCGCCCGAGGTCCTGCCCCCTCGAAGGAGGGGCCAGGCACTTGACA < 180
 CAGGCGGCGGGGATTAGCGGGCTCCAGGACGGGGAGCTTCCTCCCCGGTCCGTGAACTGT

GGCCACCCGCCTATGCACGGCCTATCAATTGTCTATTCTGCAAAAGTTTATTAGCAGAAG < 240
 CCGGTGGGCGGATACGTGCCGGATAGTTAACAGATAAGACGTTTTCAAATAATCGTCTTC

TrmBL1-Bindestelle **GLS**
 TTCTGATATTCACCTTCTGGTGATATAAGTC AAAATGAATTACAGATATCCCCCAAGATAT < 300
 AAGACTATAAGTGAAGACCACTATATTCACCTTTACTTAATGTCTATAGGGGGTTCTATA
TGM

GGTCCAGAATGGGGGAGTGGAGGGATATACGGCCTAAGGTTCCACAATGGAACGCTATAC < 360
 CCAGGTCTTACCCCCTCACCTCCCTATATGCCGGATTCCAAGGTGTTACCTTGCGATATG

TTTACACTAGCCTTTGAAGGAGAAGCCCACTTCATAACAGAAGATTCTCACAAAATTTAC < 420
 AAATGTGATCGGAACTTCCTCTTCGGGTGAAGTATTGTCTTCTAAGAGTGTTTAAATG

HindIII
 GAGTTTGAGCTTGTAGGTCCAAGGCCCACTTCTGGGGGAGATACCTAaagcttggggatc < 480
 CTCAAACCTCGAACATCCAGGTTCCGGGTGAAGACCCCTCTATGGATttcgaa cccctag

ctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctg < 540
 gagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcgacaaa ggac

tgtgaaattggttatccgctc < 560
 acactttaacaataggcgag
M13_R

Abbildung X.2.: Der *pf0132*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Phosphoglucose-Isomerase-Promotor (*pf0196*)

M13_F **EcoRI**
gccagggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagt **gaattc** CAGGGTTATTA < 60
cgtcccaaaagggtcagtgtgcaacattttgctgccggtca **cttaag** GTCCAATAAT

CTGATTCCCAGGTTACTTATACACTTGAAATATCTGGTTACTCCTGTCCTTACTCTTGGA < 120
GACTAAGGGTCCAATGAATATGTGAACCTTATAGACCAATGAGGACAGGAATGAGAACCT

TATCTCTTATTGCCTTTGTCACAATGATAACTGGAAGCATGCTTTCACCTCTTAGGCTTTG < 180
ATAGAGAATAACGGAAACAGTGTTACTATTGACCTTCGTACGAAAGTGAGAATCCGAAAC

CAAGTTATCTCCAGGGTGAGATAGAAAAAGTCAAAAAGGAGAAAAAGAAAGACACCACTG < 240
GTTCAATAGAGGTCCCACTCTATCTTTTTCAGTTTTTTCCTCTTTTCTTTCT **GTGGTGAC**

PGI
GTGGTGACG **ATG** TATAAGGAACCTTTTGGAGTGAAGGTAGACTTTGAGACTGGAATAATT < 300
CACC **CACTGCT** TACATATTCCTTGGAACCTCACTTCCATCTGAAACTCTGACCTTATTAA
TGM

GAGGGGGCAAAGAAATCTGTAAGAAGGCTAAGCGACATGGAGGGGTACTTTGTTGATGAA < 360
CTCCCCGTTTCTTTAGACATTCTTCCGATTGCTGTACCTCCCATGAAACAACACTACTT

AGGGCATGGAAAGAGCTTGTGGAGAAGGAGGATCCTGTAGTTTATGAGGTTTATGCAGTG < 420
TCCCGTACCTTTCTCGAACACCTCTTCCTCCTAGGACATCAAATACTCCAAATACGTCAC

HindIII
GAGCAGGAAGAGAAAGAGGGAGACTTAAA **aagctt** ggcgtaatcatggatcatagctgttt < 480
CTCGTCCTTCTCTTCTCCCTCTGAATTT **ttcgaa** ccgcattagtagaccagtagcgacaaa

cctgtgtgaaattggttatccgctc < 504
ggacacactttaacaataggcgag
M13_R

Abbildung X.3.: **Der *pf0196*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der 4- α -Glucanotransferase-Promotor (*pf0272*)



Abbildung X.4.: Der *pf0272*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Die vermutete BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Die Translationsstartcodons sind in roten Buchstaben dargestellt.

Der Pyrolysin-Promotor (*pf0287*)

M13_R
gagcggataacaattttcacacagga aacagctatgaccatgattacgccaagcttgcatg < 60
ctgcctattgtttaagtggtgcctttgtcgatactggtactaatgcggttcgaacgtac

SmaI
cctgcaggtcgactctagaggatc cccggg CTTTTATTGGTAGGCTTATAAAGTTTGCGC < 120
ggacgtccagctgagatctcctag gggccc GAAAAATAACCATCCGAATATTTCAAACGCG

TCTCTGGTCCTTAATTAATTTAATTTTATCCTCCTTTATCCTCCTTGATTTAAATTATAA < 180
AGAGACCAGGAATTAATTAATTTAAATAGGAGGAAATAGGAGGAATAAATTTAATATT

GATATAATCACTCCGAGTGATGAGTAAGATACATCATTACAGTCCCAAAATGTTTATAAT < 240
CTATATTAGTGAGGCT CACTAC TCATTCTATGTAGTAATGTCAGGGTTTTACAAATATTA

TGM **Pyrolysin**
TGGAACGCAGTGAATATACAAAATGAATATAACCTCGGAGGTGACTGTAGA ATGAATAAG < 300
ACCTTGCCTCACTTATATGTTTTACTTATATTGGAGCCTCCACTGACATCTTACTTATTC

AAGGGACTTACTGTGCTATTTATAGCGATAATGCTCCTTTCAGTAGTTCCAGTGCACTTT < 360
TTCCCTGAATGACACGATAAATATCGCTATTACGAGGAAAGTCATCAAGGTCACGTGAAA

GTGTCCGCAGGAACACCACCGGTTAGTTCAGAAAAATCAACAACCTTCTATACTCCCTAAC < 420
CACAGGCGTCCTTGTGGTGGCCAATCAAGTCTTTTAAAGTTGTTGAAGATATGAGGGATTG

CAACAAGTTGTGACAAAAGAAGTTTCACAAGCGGCGCTTAATGCTATAATGAAAGGACAA < 480
GTTGTTCAACACTGTTTTCTTCAAAGTGTTTCGCCGGAATTACGATATTACTTTCCTGTT

BamHI
CCCAACATGGT ggatcc ggggtaccgagctcgaattcactggccgctcggttttacaacgtcg < 540
GGTTGTACCA cctagg cccatggctcgagcttaagtaccggcagcaaaatggtgc agc

tgactgggaaaaccctggc < 559
actgacccttttgggaccg
M13_F

Abbildung X.5.: Der *pf0287*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor der extrazellulären α -Amylase (*pf0477*)

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtggaattcgagctcggtac < 60
 cggccccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

SmaI **BRE/TATA** **amy2** **+1** 
 ccGGTTCCTCCCAGGAATTGTTTTATC**AAGAGTTTATTA**GATTTTGACGTGCGTTGAT**G** < 120
 ggCCAAGAGGGGTCCTTAACAAAAATAGTTCTCAAATAATCTAAACTGCACGCAACTAC

TrmBL1-Bindestelle **AMY2** 
 AACATTTATGTTACATGATCATAACAGAAAAATTT**ATATGTATCATCACCAGTG**ATACA < 180
 TTGTAAATACAAGTGTACTAGTATTGTCTTTTAAATATAC**ATAGTAGTGGTCACTATGT**
TGM

TTATGAGACTTTGGTGTATGGAGGTGATCACGTGAACATAAAGAAATTAACACCCCTCCT < 240
 AATACTCTGAAACCACATACCTCCACTAGTGCACCTTGTATTTCTTTAATTGTGGGGAGGA

AACTCTATTACTGTTTTTTATAGTACTAGCAAGTCCAGTAAGTGCAGCAAAAATACTTGA < 300
 TTGAGATAATGACAAAAAATATCATGATCGTTCAGGTCATTACGTCGTTTTATGAACCT

SmaI
 GCTTGAAGAGGG**ggg**gaccccttagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatca < 360
 CGAACTTCTCCC**ccc**ctaggagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagt

tggtcatagctgtttcctgtgtgaaattggttatccgctc < 399
 accagtatcgacaaa**ggacacactttaacaataggcgag**
M13_R

Abbildung X.6.: **Der *pf0477*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Das verwendete Restriktionsenzym ist in lila angegeben. Die vermutete BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Phosphoglycerat-Mutase-Promotor (*pf0588*)

M13_R
gagcggataacaatttcacacagga aacagctatgaccatgattacgccaagcttgcag < 60
ctcgctattgttaaagtggtgctctttgtcgatactggtactaatgcggttcgaacgtac

SmaI
cctgcaggtcgactctagaggatc cccggg TCATTCTAAGGCCAGGAGAAAGCACATTCA < 120
ggacgtccagctgagatctcctag gggccc AGTAAGATTCCGGTCTCTTTTCGTGTAAGT

TCCCAGCGGGTGTATCCATAGACTAGAAAACCCAGGAAAAGTGGTTTTAGAAAGTAATTG < 180
AGGGTCGCCACAATAGGTATCTGATCTTTTGGGTCCTTTTACCAAAATCTTCATTAAC

AGACTCAGATAGGAGAGTATCTTGGAGAGGACGACATAGTTAGAATAGAGGACGACTACC < 240
TCTGAGTCTATCCTCTCATAGAACCTCTCCTGCTGTATCAATCTTATCTCCTGCTGATGG

PGM
AGAGGGCTTAGGTTTTTAACTTCTTTTTTATTAATCACTGGAGGTGATAAA ATG GGGGAAG < 300
TCTCCCGAATCCAAAAATTGAAGAAAAAATAA TTAGTG ACCTC CACTAT TTTACCCCTTC
TGM

CTGTTTGGAAACATTTGGAGTGAGGGGGACAGCAAACAAGGACATAACCCCAGAATTTCGCT < 360
GACAAACCTTGTAACCTCACTCCCCCTGTCGTTTGTTCCTGTATTGGGGTCTTAAGCGA

CTAAAAATAGGAATGGCATTTCGGAACCTTCTAAGGAGAGAGGGGAAGAAGAAACCAGTT < 420
GATTTTTATCCTTACCGTAAGCCTTGGAAGATTCTCTCTCCCCCTCTTCTTTGGTCAA

GTAGTAGTCGGTAGGGACACGAGAGTGAGTGGGGAAATGCTAAAGAGTGCTCTAATAAGC < 480
CATCATCAGCCATCCCTGTGCTCTCACTACCCCTTTACGATTCTCACGAGATTATTCTG

BamHI
GGACTTCTAAG ggatccc ggggtaccgagctcgaattcactggccgctcgttttacaacgtcg < 540
CCTGAAGATTCC cctagg cccatggctcgagcttaagtgaccggcagcaaaatgttgacg

tgactgggaaaaccctggc < 559
actgacccttttgggaccg
M13_F

Abbildung X.7.: **Der *pf0588*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase/Phosphatase-Promotor (*pf0613*)

```

M13_R                                     HindIII
gagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccagcgttgcatg < 60
ctcgccctattgttaaagtgtgtcctttgtcgatactggtactaatgcggttcgaaacgtac

cctgcaggtcgactctagaggatCCTTAACATTTCTCCAAAATATTTTCGGATTTGTTTAA < 120
ggacgtccagctgagatctcctaGGAATTGTAAAGAGGTTTTATAAAGCCTAAACAAATT

TATTTAACTGAGATTTAATTTACAAATACGACAATATAATCTCACAAAGATAAAAGTTTT < 180
ATAAATTGACTCTAAATTAAATGTTTATGCTGTTATATTAGAGTGTTTCTATTTTCAAAA
+12
TrmBL1-Bindestelle      FBPAse 2
ATAGAAAATTTTCTTCATCATCTCTGGGTGATAAATGTTTATCAAAGTAAAGTTTATTAGG < 240
TATCTTTTAAAAGAAAGTAGTAAGACCCACTATTTACAAATAGTTTCATTTCAAATAATCC
TGM
+11      FBPAse 1
AAAAATGTTAACATAAGTTTGTAATAATCTGGAGGTGAAAAAATGCGCAGTAGGAGAGAAG < 300
TTTTTACAATTGTATTCAAACATTTTAAGACCTCCACTTTTTTACCGTCATCCTCTCTTC

ATAACAATAAGCGTGATAAAAGCAGACGTCGGAGGGTGGCCTGGCCATTCAAGAGTTCAC < 360
TATTGTTATTCGCACTATTTTCGCTGCAGCCTCCACCGGACCGGTAAGTTCTCAAGTG

CCAGCACTTATAGAGAGGGGCAAAAGAAGTACTAAGCGAAGCTCAAAAAGAAGGAACCCTC < 420
GGTCGTGAATATCTCTCCCGTTTTCTTCATGATTGCTTCGAGTTTTTCTTCCTTGGGAG

ATAGACTTCTATGTAACCTACGCTGGAGATGACCTCCAGCTTATAATGACTCACAAGAAG < 480
TATCTGAAGATACATTGGATGCGACCTCTACTGGAGGTGCAATATTACTGAGTGTTCTTC

GGAGTTGACAGCCCAGAGATCCACGGGCTCGCTTGGGAAGCATTCAAAAAGGCCACAGAA < 540
CCTCAACTGTGCGGTCTCTAGGTGCCCCGAGCGAACCCTTCGTAAGTTTTTCCGGTGTCTT

GTGGCGAAGGAAGTACTAGGCCTATATGGAGCTGGACAGGACCTTCTAAAGGATGCATTTAGT < 600
CACCGCTTCCTTGATCCGGATATACCTCGACCTGTCTGGAAGATTTCCTACGTAAATCA

GGTAATGTTAGAGGTCTAGGTCCAAGCGTTGCAGAGATGGAAATAACACTAAGAAAGAGC < 660
CCATTACAATCTCCAGATCCAGGTTCGCAACGTCTCTACCTTTATTGTGATTCTTTCTCG

EcoRI
GAACCAATATTACATTCCGgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgctgactgggaaa < 720
CTTGGTTATAATGTAAGGccttaagtacccggcagcaaaatgttgagcactgacctttt

accctggc < 728
tgggaccg
M13_F

```

Abbildung X.8.: Der *pf0613*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Die vermutete BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des hypothetischen Proteins PF0648

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggtac < 60
 cggccccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgcccgtcacttaagctcgagccatg

BamHI
 ccggatccCTTGAGCATTGGTTTTAGCAAGGCTCTAGCCAGTGGATTTCCAAGAATTAAT < 120
 ggccctaggGAACTCGTAACCAAAATCGTTCCGAGATCGGTCACCTAAAGGTTCTTAATTA

CTGAAAGCTCTAAGGGCTGTTGTTATTTGATTTCTCCCTTTGAGGGTGGTGTGTTTCATT < 180
 GACTTTCGAGATTCCCGACAACAATAAACTAAAGGAGGGAACTCCACCACACAAGTAA
TGM

GCTTTCGAAATGGTTCCTCCAAAGCCTCACTTAAAAATCCTCTGTCATTATTCATCCC < 240
 CGAAAGCCTTTACCAAGGAGGTTTCGGAGTGAATTTTTTAGGAGACAGTAATAAGTAGGG
PF0647 ↴

CCTTTTCTGACTTGTCGGTCTTTTATAATAAACTTTACGGTTAAGATATATCAAAAATTT < 300
 GGAAAAGACTGAACAGGCAGAAAATATTATTTGAAATGCCAATTCTATATAGTTTTTAAA

CTGACATATCTAATACGTCCGAAAGATTTAAATAATACTTGCAACAAGGATAGGTTGAAG < 360
 GACTGTATAGATTATGCAGGCTTTCTAAATTTATTATGAACGTTGTTCTATCCAACCTC

↵ **PF0648**
 TGATCAAAATGCTTCCGCAAAAAGTGGGATGTGGCTGGCCATACTTGGAGGGTTGCTAA < 420
 ACTAGTTTTACCGAAGGCGTTTTTGACCCTACACCGACCGGTATGAACCTCCCAACGATT

TATTATTGGATGGAATACTAGTGCTCGCAATAAAACATTCTACGGCTGGCACTACGGAG < 480
 ATAATAACCTACCTTATGATCACGAGCGTTTTATTTTGTAAGATGCCGACCGTGATGCCTC

GAGTTTCAACAGTTGGCTGGATAGAGATAATTTTCAGTTTGATAATTATTGGCCTGGCCT < 540
 CTCAAAGTTGTCAACCGACCTATCTCTATTAAGTCAAACCTATTAATAACCGGACCGGA

HindIII
 ACTACTACAAGAGCAACAAAAGGCCATaagcttggggatcctctagagtcgacctgcag < 600
 TGATGATGTTCTCGTTGTTTTTCCGGTAttcgaaaccctaggagatctcagctggacgtc

gcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctc < 661
 cgtacgttcgaaccgcattagtagcagatcgacaaaaggacacactttaacaataggcgag
M13_R

Abbildung X.9.: **Der *pf0648*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, die Translationsstartcodons in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor der δ -Untereinheit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (*pf0967*)

```

M13_F                                EcoRI
gccagggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagt gaattcCTGAAGCTCCA < 60
cggtcccaaaaggggtcagtgctgcaacattttgctgcccgtca cttaagGAATTGAGGT

GGGAAGATTTAAATACATGACAAAAGAAGATATTGAGACACTTCAAAAATGGGTATTGGA < 120
CCCTTCTAAATTTATGTACTGTTTTCTTCTATAACTCTGTGAAGTTTTTACCCATAACCT

AGAAATGGGAAAGGCTAAAGAAGCTTGCCGAGGTCTTTGGATGACCTATATGCTTAAATTT < 180
TCTTACCCTTTCCGATTTCTTCGAACGGCTCCAGAAACCTACTGGATATACGAATTTAAA

                                     ┐ POR UE  $\delta$ 
TTATTTTGAAAACCTCACTCGAGGTGGTAAATATGGCTGAAAGTCCGTTTAAGGCCGATAT < 240
AATAAACTTTTGAGTGAGCTCCACCATTTATACCGACTTTCAGGCAAATTCCGGCTATA
                                     TGM

AGAAAGAGCCCCAAAAGAGTTAAGTGAAAAAATGACACCCGGAGCAATAGTCTACATTCC < 300
TCTTCTCGGGTTTTTCTCAATTCACTTTTTTTACTGTGGGCCTCGTTATCAGATGTAAGG

AGGAAGTAGCGTCATTAATAAACTGGATCTTGAGAGTTTTTAAGCCAGAGTTCAACAG < 360
TCCTTCATCGCAGTAATTATTTTGACCTAGAACCTCTCAAAAATTCGGTCTCAAGTTGTC

                                     BamHI
GGACAAGTGTGTAAGGTGTTATCTCTGCTACATCTACTGTCCAGAGCCTGCggatccctc < 420
CCTGTTACACATTCCACAATAGAGACGATGTAGATGACAGGTCTCGGACGcctagggag

tagagtcgacctgcagggcatgcaagcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgt < 480
atctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcgacaaaggacaca

gaaattggttatccgctc < 497
ctttaacaataggcgag
                                     M13_R

```

Abbildung X.10.: **Der *pf0967*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des hypothetischen Proteins PF1085.1n

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggtac < 60
 cgtgcccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

BamHI
 ccggatccCAAGGCTGCTAAAGATATAGATAGGAGGATCGTTGAAAGGCTTAAAGATCCA < 120
 ggcttaggGTTCCGACGATTTCTATATCTATCCTCCTAGCAACTTCCGAATTTCTAGGT

AACACCACTGCAGTTATAGAGATTATTGTGGATGATGAGTAGTCAGAAGGCTGAGTTGAT < 180
 TTGTGGTGACGTCAATATCTCTAATAACACCTACTACTCATCAGTCTTCCGACTCAACTA

GATGAAGGACGCCCACGCCTGACTCTTTTCTATATATTGCTATATAGACTATTGTCTATT < 240
 CTACTTCCTGCGGGTGCGGACTGAGAAAAGATATATAACGATATATCTGATAACAGATAA

⤴ **PF1085.1n** **TrmBL1-Bindestelle**
 ACATATTCTATTTTCGAAATGTTTATATATGTTATATGGTATCACTTCTAGTGGTGATGGA < 300
 TGTATAAGATAAAAGCTTTACAAATATATACATATACCATAGTGAAGATCACCACACCT
TGM

AATGGAGAGGTATGAGAGCAAAATAGTAATCCTACCACAGTTTGGAGGATGCTCAACAA < 360
 TTACCTCTCCATACTCTCGTTTTATCATTAGGATGGTGTCAAAACCTCCTACGAGTTGTT

GTTCTCCAGGAAGAGAAGAGAAGGAAGAGCAAGAAGTAGCCCAACCAGTGGGGCCACC < 420
 CAAGGAGGGTCCTTCTCTTCTCTCCTTCTCGTTCTTCATCGGGTTGGTCACCCCGGTGG

HindIII
 AAACGAAGTGGCAGTGGAATATGAAAAAGCAAAGGTAATGATAACCAGaagcttggggat < 480
 TTTGCTTCACCGTCACCTTATACTTTTTCGTTTCCATTACTATTGGTCTtcgaaaccccta

cctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaaatcatgggtcatagctgtttcct < 540
 ggagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcgacaaa gga

gtgtgaaattgttatccgctc < 561
 cacactttaacaataggcgag
M13_R

Abbildung X.11.: Der *pf1085.1n*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben dargestellt, das TrmBL1-Bindemotiv ist hellblau umrandet. Das Translationsstart-codon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des hypothetischen Proteins PF1109

M13_R
gagcgggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgcacg < 60
ctcgctattgttaaagtgtgtcctttgtcgatactggtactaatgcggttcgaacgtac

SmaI
cctgcaggtcgactctagaggatcccccccggtTCTTAAAGAGAAGGGTTATAGGGAGG < 120
ggacgtccagctgagatctcctagggggggcccAGAATTTCTCTTCCCAATATCCCTCC

AATTCAACCTTAAAGTTGTGATTGACAAAGGAGGATTACATAACGAGTACTATTGGGGAA < 180
TTAAGTTGGAATTTCAACACTAAGTGTTCCTCCTAATGTATTGCTCATGATAACCCCTT

AGAGATTCCCTCAAGCCGTTCTGTGGCTCTTTGAAGAGTAGCTTTTATGCACATATTTAG < 240
TCTCTAAGGGAGTTCGGCAAGACACCGAGAACTTCTCATCGAAAATACGTGTATAAATC

ACCCAACAAAATATTTAAACTTCTCAGTGACTAAATATCACTTGAGGTGACACCATGAGA < 300
TGGGTTGTTTTATAAATTTGAAGAGTCACTGATTTATAGTGAACCTCACTGTGGTACTCT
TGM

AGGAATGCCCAGGTCTTTGCTATGGTGCTCTTATTAGTACTTTCAGGAATCCCAAGGCG < 360
TCCTTACGGGTCCAGAAACGATACCACGAGAATAATCATGAAAGTCCTTAAGGGTTCCGC

CTTGCACTGTACACTCCAACACCGTTTTCAATAGATGGAACTTAGAGGAATGGATCAAA < 420
GAACGTGACATGTGAGGTTGTGGCAAAAGTTATCTACCTTTGAATCTCCTTACCTAGTTT

GCAGATGCTATTGCTTATGGAAGAGACTCCGGCCTTCCAGGAGCAAACCTTGACAAATTG < 480
CGTCTACGATAACGAATACCTTCTCTGAGGCCGGAAGGTCCTCGTTTGGAAGTGTTTAAC

BamHI
TACATTGCCTGGGAggatccgggtaccgagctcgaattcactggccgctcgttttacaacg < 540
ATGTAACGGACCTcctaggcccatggctcgagcttaagtgaccggcagcaaaatgttgc

tcgtgactgggaaaaccctggc < 562
agcactgacccttttgggaccg
M13_F

Abbildung X.12.: Der *pf1109*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des hypothetischen Transportproteins PF1350

M13_F
 gccaggggttttccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggtac < 60
 cggccccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

BamHI
 ccggatccCCCCACAAGTATCTGACAGGAATAATAACAGATAGAGGTGTAGTTTGGCCA < 120
 ggcttaggGGGGGTGTTTCATAGACTGTCTTATTATTGTCTATCTCCACATCAAACCGT

CCATTCAAGAGGAACCTCAAGAAGCTCTTTGAAACCCTCTAATTTCTTTTCCACTTCTT < 180
 GGTAAGTTCTCCTTGGAGTTCTTCGAGAAACTTTGGGAGATTAAAGAAAAAGGTGAAGAA

TGGGAGTTTATAAGTAAATGAGACTTATAAACCCCTTTTGAAGAGTTTATAAACTCCATG < 240
 ACCCTCAAATATTCATTTACTCTGAATATTTGGGGAAAGCTTCTCAAATATTTGAGGTAC

└ PF1350

CCTTCTTTCACCACCCTCGATGAAAGCGATGAAAAACACGAAGAGAAGGGATTTAATGGT < 300
 GGAAGAAA GTGGTGGGAGCTACTTTTGTGCTTCTCTTCCCTAAATTACCA
 TGM

CCAAAGCAAGAAGAGGGTAAAGAAAGAAACATATCCAGGCTTAGAGGCTCCTGGTTTTTA < 360
 GGTTTCGTTCTTCTCCATTTCTTTCTTTGTATAGGGTCCGAATCTCCGAGGACCAAAAT

CTCCTTCATACCATTTAAGATAGCCACGGGGGAATAACTCCCCTAATTCCAACCTTGGC < 420
 GAGGAAGTATGGTAAATTCTATCGGTGCCCCCTTATTGAGGGGATTAAGGTTGAAACCG

HindIII

ATTGGAGGTTAATGCAACCCCTCTAGATTTGAGCTACCTCTCGGGAACaagcttggggat < 480
 TAACCTCCAATTACGTTGGGGAGATCTAAACTCGATGGAGAGCCCTTGttcgaa ccccta

cctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttccct < 540
 ggagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcgacaaa gga

gtgtgaaattgttatccgctc < 561
 cacactttaacaataggcgag
 M13_R

Abbildung X.13.: Der *pf1350*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen, das Translationsstartcodon in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor eines vermuteten Transkriptionsregulators der PadR-Familie (*pf1476*)

M13_F
gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggta < 60
cgggcccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgcccggtcacttaagctcgagccatg

SmaI **BRE/TATA**
ccTTCAAGCATTTTTATTCACTTCAAGTATTGGGT**AACCGAAAAATAT**TTTAATAAGATA < 120
ggAAGTTCGTAAAAATAAGTGAAGTTCATAACCCATTGGCTTTTTATAAAATTATTCTAT

pf1476 → **+1** **TrmBL1-Bindestelle** **PF1476**
TGT TTTATG **GTG**AGA **GAATATATTTTCATCGAAGGTGATAAAAAATGGA**GGAGCCTATACTC < 180
ACAAAATACCACTCTCTTATAT**AAAGTA**GCTTC**CACTAT**TTTTACCTCCTCGGATATGAG
TGM

AGACTTAGGGATAAACTCACGAAAGAAATGTTGTGGATGTACATACTAAAGTTGCTCAAG < 240
TCTGAATCCCTATTTGAGTGCTTTCTTTACAACACCTACATGTATGATTTCAACGAGTTC

GACAGGCCAATGTATGCGTATGAAATCAGAAACGAGCTAAAAAAGAGATTGGGCTTTGAA < 300
CTGTCCGGTTACATACGCATACTTTAGTCTTTGCTCGATTTTTTCTCTAAGCCGAAACTT

CCAGCTACCGTGAGCTCATATGTAGTTCTATATAGGCTGGAAGAAGGAGGTTATGTATCC < 360
GGTCGATGGCACTCGAGTATACATCAAGATATATCCGACCTTCTTCCTCCAATACATAGG

SmaI
TC**ggg**gatcctctagagtcgacctgcagggcatgcaagcttggcgtaatcatggatcatagc < 420
AG**ccc**ctaggagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcg

tgtttcctgtgtgaaattggtatccgctc < 449
acaaa**ggacacactttaacaataggcgag**
M13_R

Abbildung X.14.: Der *pf1476*-Promotor. Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Das verwendete Restriktionsenzym ist in lila angegeben. Die vermutete BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Glutamat-Dehydrogenase-Promotor (*pf1602*)

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaaattcgagctcggtac < 60
 cggccccaaaaggggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

BamHI
 ccgggggatcccGAATTTTAGATTCTTTGAGCCTAATCAAATAAACAAAAGGATTTCCACTC < 120
 ggcccctaggCTTAAATCTAAGAACTCGGATTAGTTTATTTGTTTTCTAAAGGTGAG

BRE/TATA *gdh* →
 +1
 TTGTTTACC**GAAAGCTTTATATA**AGGCTATTGCCCAAAAATGTATCGCCAATCACCTAATT < 180
 AACAAATGGCTTTCGAAATATATCCGATAACGGGTTTTTACATAGCGGTTAGTGGATTAA

GDH
 TGGAGGGATGAAC**ATG**GTTGAGCAAGACCCCTATGAAATTGTTATTAAGCAACTTGAAAG < 240
 ACCTCCCTACTTGTACCAACTCGTTCTGGGGATACTTTAACAATAATTCGTTGAACTTTC

AGCTGCCCAATATATGGAGATAAGTGAAGAAGCTCTTGAGTTCTTAAAGAGACCTCAAAG < 300
 TCGACGGGTTATATACCTCTATTCACTTCTTCGAGAACTCAAGAATTTCTCTGGAGTTTC

BamHI
 AATTGTTGAGGTCACAATTCCAGTAGAA**ggatcc**tctagagtcgacctgcaggcatgcaa < 360
 TTAACAACCTCAGTGTTAAGGTCATCTT**cctagg**agatctcagctggacgtccgtacggt

gcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattggtatccgctc < 413
 cgaaccgcattagtaccagtatcgacaaa**ggacacactttaacaataggcgag**
M13_R

Abbildung X.15.: **Der *pf1602*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Das verwendete Restriktionsenzym ist in lila angegeben. Die BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des Trehalose/Maltose-Bindeproteins PF1739

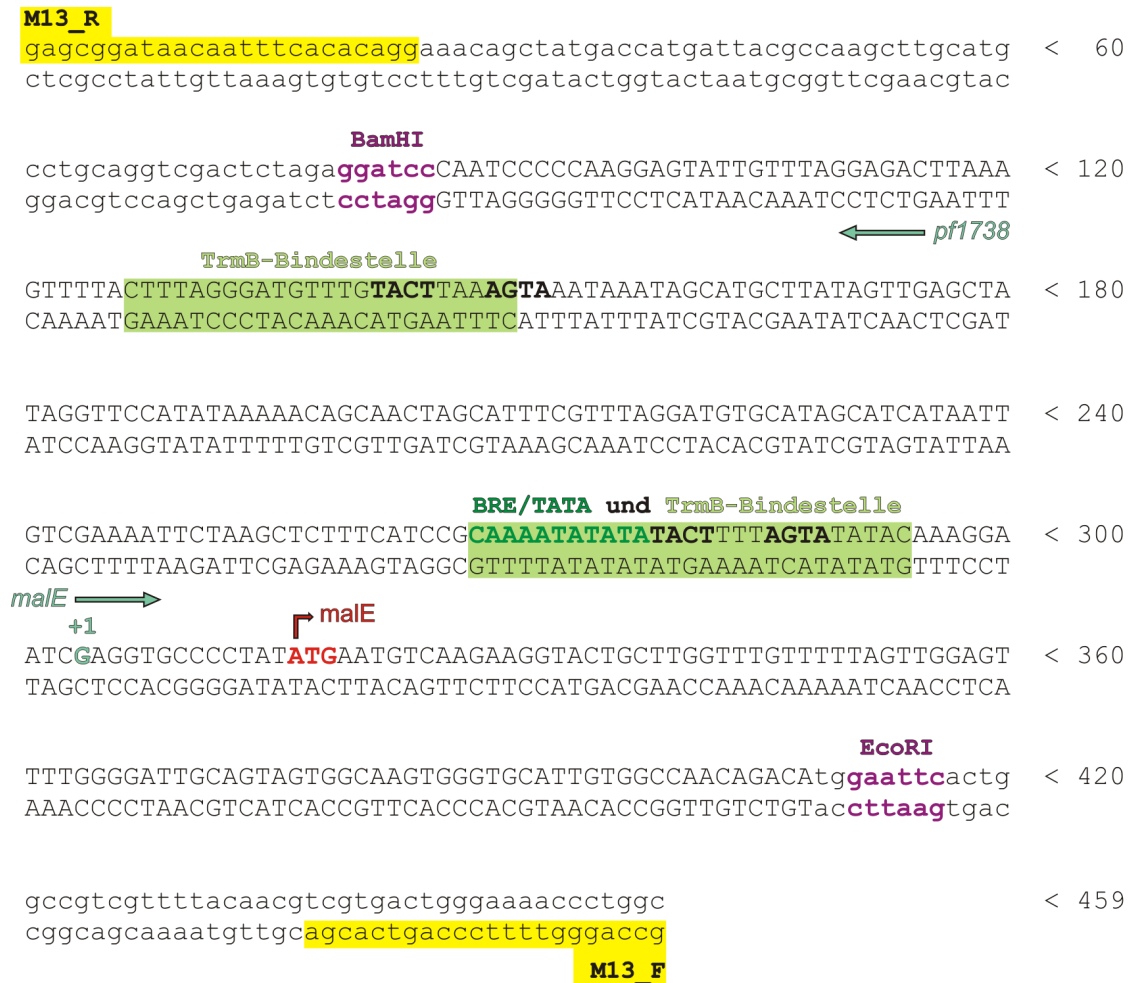


Abbildung X.16.: **Der *pf1739*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Die BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 angegeben. Die beiden pseudopalindromischen Bindesequenzen sind fett hervorgehoben. Die TrmB-Bindestellen sind hellgrün hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Phosphofructokinase-Promotor (*pf1784*)



Abbildung X.17.: **Der *pf1784*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Die BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 dargestellt. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Promotor (*pf1874*)

M13_F
 gccaggggttttcccagtcacga cgttgtaaaacgacggccagtgaattcgagctcggtac < 60
 cgggcccaaaagggtcagtgctgcaacattttgctgccggtcacttaagctcgagccatg

SmaI
 ccATTAGAATCGAATTTGAAGTTGTGGGTACTCTTCCTAATCAGACAATGCCAGTAAATA < 120
 ggTAATCTTAGCTTAAACTTCAACACCCATGAGAAGGATTAGTCTGTTACGGTCATTTAT

TrmBL1-Bindestelle
 GTCACCTTTGAGTGAAAAC AACCCCTTAAAATTTTCATTTTATAATCTAAATCTGGTGAGGTA < 180
 CAGTGAAACTCAGTTTGTGTTGGGAATTTTAAAGTAAAATATTAGATTTAGACCACTCCAT

TGM
 ↗ **GAPDH**
 AA**GTG**AAAATAAAGGTCGGAATTAATGGATATGGGACAATTGGAAAGAGGGTAGCCTACG < 240
 TTCACCTTTTATTTCAGCCTTAATTACCTATACCCTGTAAACCTTTCTCCCATCGGATGC

CCGTAACTAAGCAAGATGACATGGAGCTCATAGGAGTTACAAAACTAAGCCTGATTTTG < 300
 GGCATTGATTTCGTTCTACTGTACCTCGAGTATCCTCAATGTTTTTGATTTCGGACTAAAC

SmaI
 AA**ggg**gatacctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggatcatagc < 360
 TT**ccc**ctaggagatctcagctggacgtccgtacgttcgaaccgcattagtagtaccagtatcg

tgtttcctgtgtgaaattggttatccgctc < 389
 acaaa**ggacacactttaacaataggcgag**
M13_R

Abbildung X.18.: **Der *pf1874*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Das verwendete Restriktionsenzym ist in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der Promotor des Maltodextrin-Bindeproteins PF1938



Abbildung X.19.: **Der *pf1938*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Die BRE/TATA-Box ist in grünen Buchstaben, der Transkriptionsstart in hellblau mit +1 dargestellt. Die Hälfte der pseudopalin-dromischen Bindesteque für TrmB ist fett gedruckt, die TrmB-Bindestelle ist hellgrün hinterlegt. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

Der L-Asparaginase-Promotor (*pf2047*)

M13_R
gagcggataacaattttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaaagcttgcattg < 60
ctcgccctattgtttaagtggtgcctttgtcgatactggtactaatgcggttcgaacgtac

SmaI
cctgcaggtcgactctagaggatc**cccggg**TTGAAAAAGAAGGACACTTAATAATAGGAC < 120
ggacgtccagctgagatctcctag**gggccc**AACCTTTTCTTCCTGTGAATTATTATCCTG

TACCAAGATACATGGAAGTTAATATTAAAGATGGCAAGATCATTGGGAGAAGCCTAGATC < 180
ATGGTTCATGTACCTTCAATTATAATTTCTACCGTTCTAGTAACCCTCTTCGGATCTAG

TrmBL1-Bindestelle
CCAGGGAAGGAGGACTTTATGGTTCAGCAGA**GGTTAGTGTCCCTGAGGGTGTAAATGGG** < 240
GGTCCCTTCCTCCTGAAATACCAAGTCGTCTCCAATC**ACAGGG**ACTCC**CACAAT**TTACCC
TGM

AAATATATCCAAACCTGTGGCCAGGAGATTTATGATTTTCGAAATTTTTTCAAAACGCT < 300
TTTATATAGGTTTGGGACACCGGTCCTCTAAATACTAAAAGCTTTAAAAAAGTTTTGCGA

GAACAAATGTCAATTTTTCTTTTCTACACCTTATAAATTGTCGACAAAAATACTAAAAAG < 360
CTTGTTTACAGTTAAAAAGAAAAGATGTGGAATATTTAACAGCTGTTTTTATGATTTTTT

L-Asparaginase
GGGGTATTTTAGTTATCATGGTGATTAAAT**GTG**AAAATTCTTCTAATTGGGATGGGTGGA < 420
CCCCATAAAATCAATAGTACCACTAATTTACACTTTTAAGAAGATTAACCCTACCCACCT

ACAATTGCGAGTGTAAGGGCGAGAATGGATATGAGGCTTCGTTGTCCGTTAAAGAAGTT < 480
TGTTAACGCTCACATTTCCCGCTCTTACCTATACTCCGAAGCAACAGGCAATTTCTTCAA

TTAGATATCGCCGAATCAAAGATTGTGAGGATTGTGATTTTCTCGATTTAAAGAACGTT < 540
AATCTATAGCGGCCTTAGTTTCTAACACTCCTAACACTAAAAGAGCTAAATTTCTTGCAA

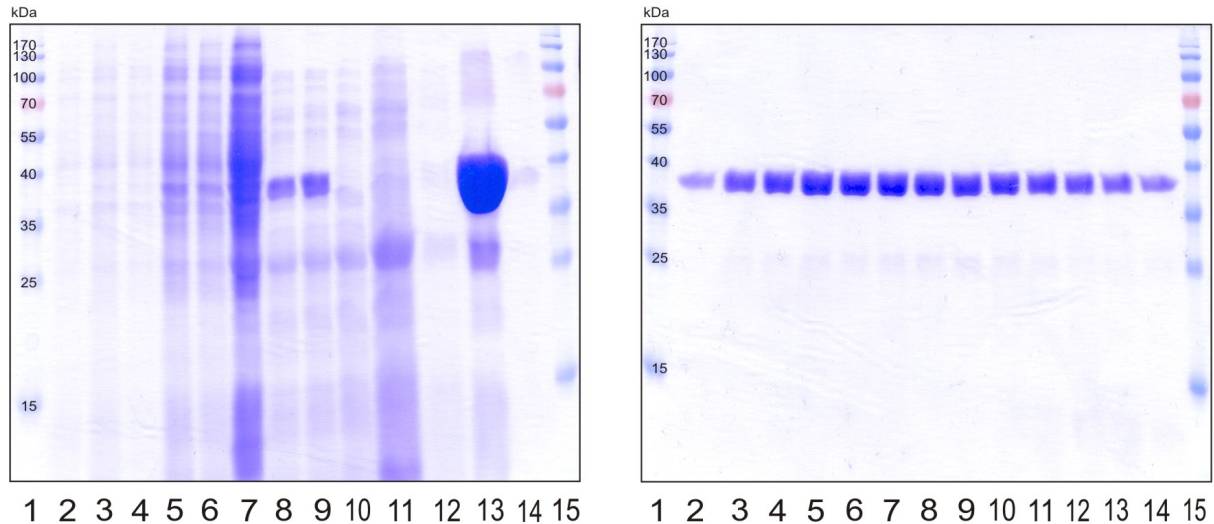
BamHI
GATAGCACGCTTATCCAGCCAGAAGATTGGGTAGATCTTGCTGAAACTCT**ggatcc**gggt < 600
CTATCGTGCGAATAGGTCGGTCTTCTAACCCTCTAGAACGACTTTGAGAC**cctagg**ccca

accgagctcgaattcactggccgctcggttttacaacgctcgctgactgggaaaaccctggc < 658
tggctcgagcttaagtgaccggcagcaaaatgttgc**agcactgacccttttgggaccg**
M13_F

Abbildung X.20.: **Der *pf2047*-Promotor.** Die beiden verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in lila angegeben. Das TGM ist in dunkelblauen Buchstaben wiedergegeben, die TrmBL1-Bindestelle ist hellblau hinterlegt. Das Translationsstartcodon ist in roten Buchstaben dargestellt.

2. Proteinreinigungen

Proteinreinigung TrmB



Gel 1:

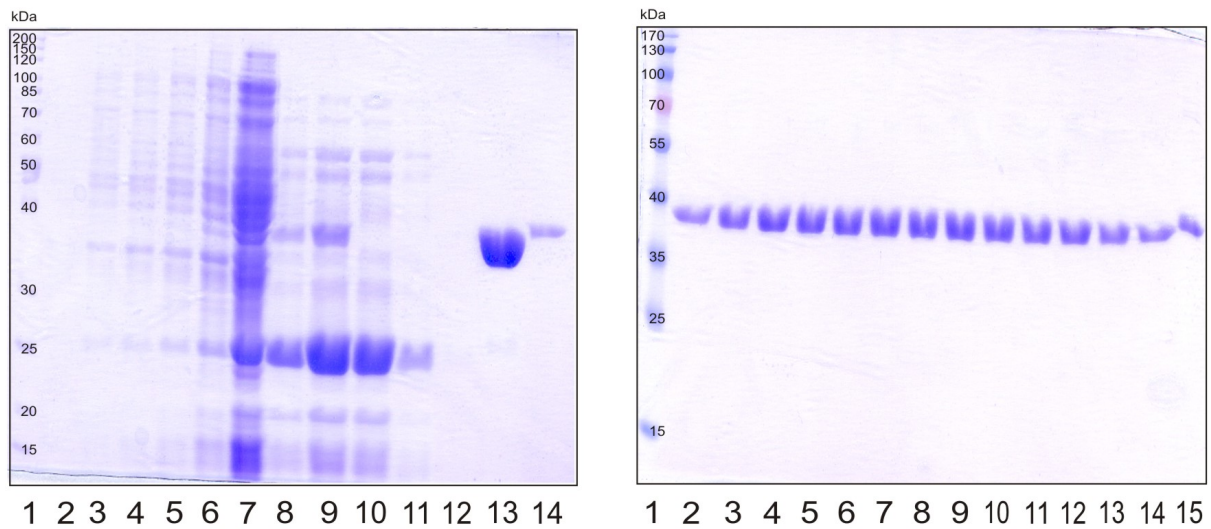
- 1 Standard
- 2 vor Induktion
- 3 1 h nach Induktion
- 4 2 h nach Induktion
- 5 3 h nach Induktion
- 6 4 h nach Induktion
- 7 nach Fast Prep
- 8 nach Hitzeschritt
- 9 nach Filtration
- 10 Durchlauf
- 11 Waschen 1
- 12 Waschen 2
- 13 Eluat Ni-NTA
- 14 Eluat Superdex D05
- 15 Standard

Gel 2 (Eluate Superdex-Säule):

- 1 Standard
- 2 E08
- 3 E09
- 4 E10
- 5 E11
- 6 E12
- 7 F01
- 8 F02
- 9 F03
- 10 F04
- 11 F05
- 12 F06
- 13 F07
- 14 G09
- 15 Standard

Abbildung X.21.: **Proteinreinigung TrmB.** In Gel 1 sind die Stichproben der Expression sowie der Eluate von Ni-NTA- und Superdex-Säule dargestellt. Gel 2 zeigt Stichproben der Superdex-Eluate.

Proteinreinigung TrmBL1



Gel 1:

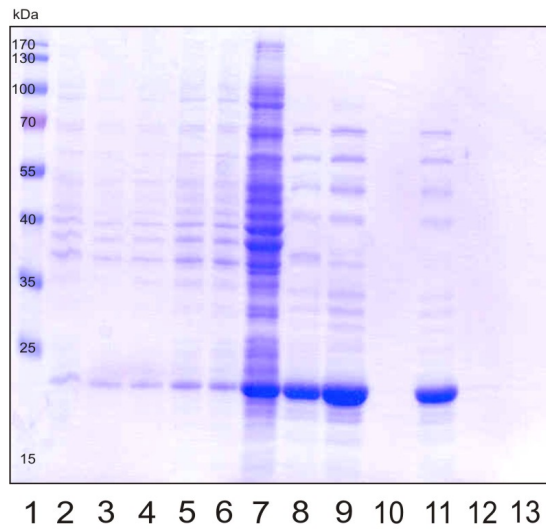
- 1 Standard
- 2 vor Induktion
- 3 1 h nach Induktion
- 4 2 h nach Induktion
- 5 3 h nach Induktion
- 6 4 h nach Induktion
- 7 nach Fast Prep
- 8 nach Hitzeschritt
- 9 nach Filtration
- 10 Durchlauf
- 11 Waschen 1
- 12 Waschen 2
- 13 Eluat Ni-NTA
- 14 TrmBL1-Vergleichsprotein

Gel 2 (Eluate Superdex-Säule):

- 1 Standard
- 2 D01
- 3 D04
- 4 D07
- 5 D10
- 6 E01
- 7 E04
- 8 E05
- 9 E06
- 10 E07
- 11 E08
- 12 E09
- 13 E10
- 14 E11
- 15 TrmBL1-Vergleichsprotein

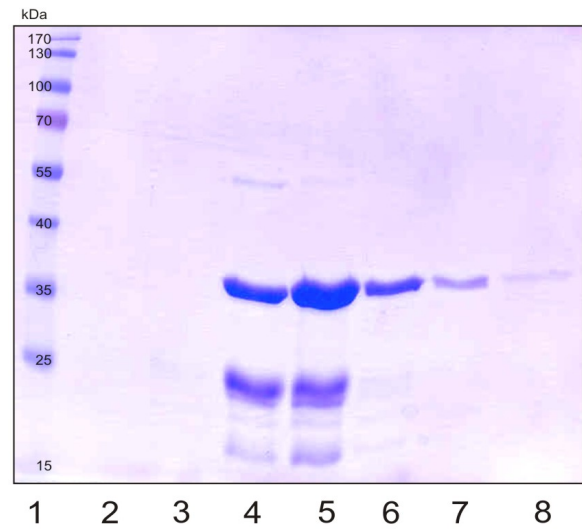
Abbildung X.22.: **Proteinreinigung TrmBL1.** In Gel 1 sind die Stichproben der Expression sowie des Eluats der Ni-NTA-Säule dargestellt. Gel 2 zeigt Stichproben der Superdex-Eluate.

Proteinreinigung TrmB mit RH1 von TrmBL1



Gel 1:

- 1 Standard
- 2 vor Induktion
- 3 1 h nach Induktion
- 4 2 h nach Induktion
- 5 3 h nach Induktion
- 6 4 h nach Induktion
- 7 nach Fast Prep
- 8 nach Hitzeschritt
- 9 Durchlauf
- 10 Waschen 3
- 11 Waschen 1
- 12 Waschen 2
- 13 Waschen 4

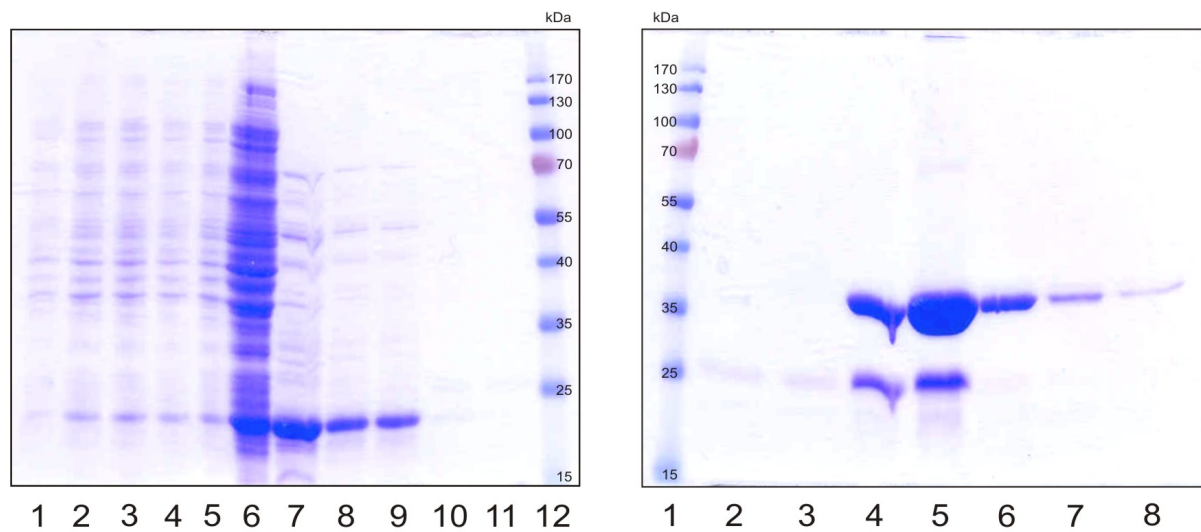


Gel 2 (Eluate Ni-NTA-Säule):

- 1 Standard
- 2 Eluat 1
- 3 Eluat 2
- 4 Eluat 3
- 5 Eluat 4
- 6 Eluat 5
- 7 Eluat 6
- 8 Eluat 7

Abbildung X.23.: **Proteinreinigung TrmB mit RH1 von TrmBL1.** In Gel 1 sind die Stichproben der Expression dargestellt. Gel 2 zeigt Stichproben der Ni-NTA-Eluate.

Proteinreinigung TrmBL1 mit RH1 von TrmB



Gel 1:

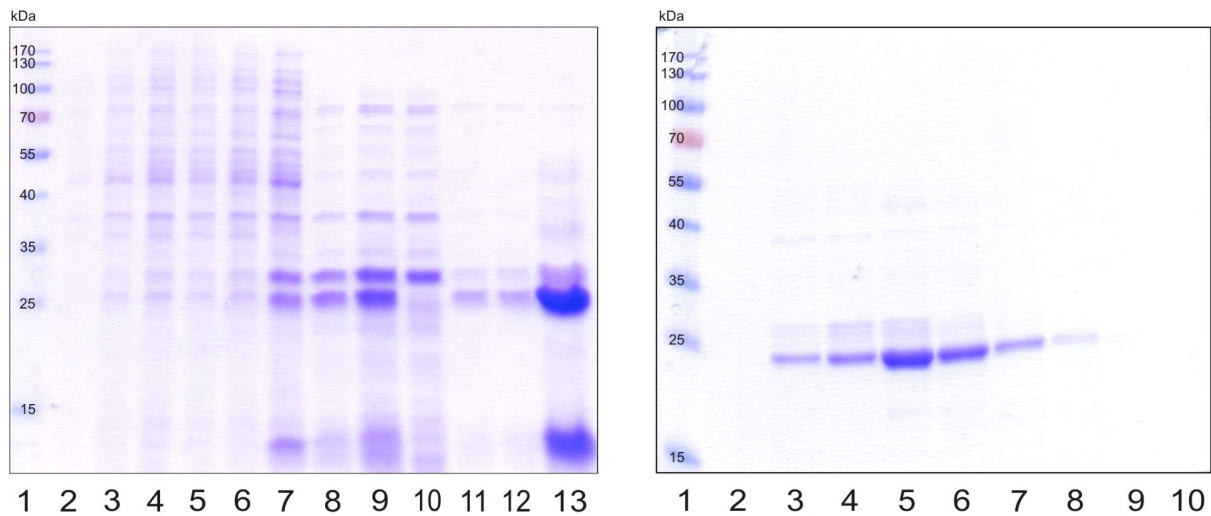
- 1 vor Induktion
- 2 1 h nach Induktion
- 3 2 h nach Induktion
- 4 3 h nach Induktion
- 5 4 h nach Induktion
- 6 nach Fast Prep
- 7 Durchlauf
- 8 Waschen 1
- 9 Waschen 2
- 10 Waschen 3
- 11 Waschen 4
- 12 Standard

Gel 2 (Eluate Ni-NTA-Säule):

- 1 Standard
- 2 Eluat 1
- 3 Eluat 2
- 4 Eluat 3
- 5 Eluat 4
- 6 Eluat 5
- 7 Eluat 6
- 8 Eluat 7

Abbildung X.24.: **Proteinreinigung TrmBL1 mit RH1 von TrmB.** In Gel 1 sind die Stichproben der Expression dargestellt. Gel 2 zeigt Stichproben der Ni-NTA-Eluate.

Proteinreinigung aMBF1



Gel 1:

- 1 Standard
- 2 vor Induktion
- 3 1 h nach Induktion
- 4 2 h nach Induktion
- 5 3 h nach Induktion
- 6 4 h nach Induktion
- 7 nach Fast Prep
- 8 nach Hitzeschritt
- 9 nach Filtration
- 10 Durchlauf
- 11 Waschen 1
- 12 Waschen 2
- 13 Eluat Ni-NTA

Gel 2 (Eluate Superdex-Säule):

- 1 Standard
- 2 B12
- 3 D05
- 4 D07
- 5 D11
- 6 E01
- 7 E03
- 8 E05
- 9 E10
- 10 F03

Abbildung X.25.: **Proteinreinigung aMBF1**. In Gel 1 sind die Stichproben der Expression sowie des Eluats der Ni-NTA-Säule dargestellt. Gel 2 zeigt Stichproben der Superdex-Eluate.

XI. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sein stetiges Interesse und seine große Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn PD Dr. Winfried Hausner danke ich sehr für die Einbringung neuer Ideen, sein stetes Engagement zur Bewältigung auftretender Probleme und seiner Zeit für wissenschaftliche Diskussionen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Ingrid Waage und Robert Reichelt. Mit ihrem Wissen, ihren stets guten Ideen sowie tollen Lösungsvorschlägen haben sie sehr stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch Stefan Dext gilt mein großer Dank. Diverse „Raucherpausen“ mit wissenschaftlichen Diskussionen halfen wieder klare Gedanken zu fassen und mit neuer Motivation an bestehende Probleme heranzugehen.

Meinen Laborkollegen Dr. Andreas Bosch und Wolfgang Forster danke ich für die besonders tolle Arbeitsatmosphäre und die stets gute Zusammenarbeit.

Da es nahezu unmöglich ist, alle aktuellen und ehemaligen Kollegen und Mitarbeiter des *Lehrstuhls für Mikrobiologie und Archaeenzentrum* in Regensburg einzeln aufzuzählen und deren Beitrag zu dieser Doktorarbeit zu würdigen, möchte ich mich hier bei allen sehr herzlich für die tolle Zusammenarbeit, die enorme Hilfsbereitschaft und die wunderbare Zeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern und meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und insbesondere während der Doktorarbeit bedanken. Ohne sie wäre diese Promotion nicht möglich gewesen.

XII. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Folgende Publikation wurde bereits veröffentlicht:

Gindner A., Hausner W., and Thomm M. (2014). The TrmB family: a versatile group of transcriptional regulators in Archaea. *Extremophiles*, 18(5):925-936

Regensburg, im September 2014